

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA
FACULTAD DE FARMACIA



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

**Actividades enzimáticas de *Terribacillus* sp. AE2B 122
con aplicaciones medioambientales**

Almudena Escobar Niño

Sevilla, 2016

Memoria que presenta la Lcda. en
Bioquímica Almudena Escobar Niño para
optar al grado de Doctor por la Universidad
de Sevilla



ENCARNACIÓN MELLADO DURÁN, CATEDRÁTICA DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA Y DAVID CÁNOVAS LÓPEZ PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE GENÉTICA, AMBOS DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA,

INFORMAN: Que la Tesis Doctoral titulada: "Actividades enzimáticas de *Terribacillus* sp. AE2B 122 con aplicaciones medioambientales", presentada por la Lcda. en Bioquímica ALMUDENA ESCOBAR NIÑO, para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el Departamento de Microbiología y Parasitología y Departamento de Genética, ambos de la Universidad de Sevilla, bajo nuestra dirección, reuniendo los requisitos exigidos.

Y para que así conste, expedimos y firmamos el presente informe en Sevilla, a 25 de Abril de 2016.

Fdo.: Encarnación Mellado Durán

Fdo.: David Cánovas López



MIGUEL ANGEL CAVIEDES FORMENTO, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA Y ANDRÉS AGUILERA LÓPEZ, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE GENÉTICA, AMBOS DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA,

INFORMAN: Que la Tesis Doctoral titulada: “Actividades enzimáticas de *Terribacillus* sp. AE2B 122 con aplicaciones medioambientales”, presentada por la Lcda. en Bioquímica ALMUDENA ESCOBAR NIÑO, para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el Departamento de Microbiología y Parasitología y Departamento de Genética, ambos de la Universidad de Sevilla, bajo la dirección de los Doctores Dña. ENCARNACIÓN MELLADO DURÁN y D. DAVID CÁNOVAS LÓPEZ.

Y para que así conste, expedimos y firmamos el presente informe en Sevilla, a 25 de Abril 2016.

Fdo.: Miguel Ángel Caviedes Formento

Fdo.: Andrés Aguilera López

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido parcialmente financiada mediante las ayudas de los siguientes Proyectos de Investigación:

Desarrollo de sistemas biológicos para la obtención de energías renovables (Biodiésel) (P08-RNM-3515). Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía. 2009-2012.

Extremozimas lipolíticas como catalizadores regioselectivos útiles en la síntesis de carbohidratos y polifenoles lipófilos (P11-CVI-7427 MO). Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía. 2013-2016.

Parte de los resultados de esta Tesis han sido publicados en los siguientes medios:

1. Artículos científicos

- a. **Escobar-Niño A**, Luna C, Luna D, Marcos AT, Cánovas D y Mellado E. (2014). Selection and Characterization of Biofuel-Producing Environmental Bacteria Isolated from Vegetable Oil-Rich Wastes. PLoS ONE 9(8): e104063.

2. Comunicaciones y ponencias presentadas a congresos

- a. Título: Proceedings of the V International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld 2013): "Industrial, medical and environmental applications of microorganisms. Current status and trends"
Editorial: Wageningen Academic Publishers. Lugar: MADRID (ESPAÑA). Año: 2014. Páginas: 464-469. ISBN: 978-90-8686-243-6

Título: "Production of biodiesel-like biofuel by enzymatic extracts from wild strains in vegetable oil environments"

Co-autores: C. Luna, **A. Escobar-Niño**, E.D. Sancho, E. Mellado, D. Cánovas, D. Luna, J. Calero, A. Posadillo, F.M. Bautista, A.A. Romero y C. Verdugo.

- b. Título: Screening de microorganismos lipolíticos para la producción de biodiesel

Co-autores: **A. Escobar**, D. Luna, D. Cánovas y E. Mellado

Tipo de participación: Póster PS104.

Congreso: XXXVIII Congreso de la Sociedad Española de Genética

Lugar de celebración: MURCIA (SPAIN)

Fecha: Septiembre de 2011

- c. Título: Obtention of lipasidic enzymatic extracts from wild microbial strains sampled in vegetable oil environments, as their evaluation and selection as biocatalysts in the ethanolysis of triglycerides to produce biofuel that integrates glycerine

Co-autores: Luna Durán, Carlos; **Escobar-Niño, Almudena**; Sancho Puebla, Enrique; Mellado Durán, Encarnación; Cánovas López, David; Luna Martínez, Diego; Calero Mármol, Juan; Bautista Rubio, Felipa María; Romero Reyes, Antonio Ángel; Posadillo Marín, Alejandro; Verdugo Escamilla, Cristóbal; Rodríguez Ortiz, Salvador Luis

Tipo de participación: Póster W134.
Congreso: V International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld 2013).
Lugar de celebración: MADRID (SPAIN)
Fecha: Octubre de 2013

- d. Título: Síntesis quimioenzimática regioselectiva de carbohidratos acetilados a partir de lipasas

Co-autores: L. Sánchez Barrionuevo, M. Guzmán, D. Cánovas, **A. Escobar-Niño**, J.G. Fernández-Bolaños, I. Maya, O. López y E. Mellado.

Tipo de participación: Oral.
Congreso: Primeras Jornadas Españolas de Biocatálisis (JEB15).
Lugar de celebración: MADRID (ESPAÑA)
Fecha: Julio de 2015

3. Patentes:

- a. Cepa microbiana *Terribacillus* sp. AE2b 122 con capacidad para llevar a cabo reacciones de transesterificación y usos de la misma
A. Escobar, D. Cánovas, D. Luna, E. Mellado

Patente española P201300039 (2013)

- b. Cepas bacterianas y sus usos en reacciones de acilación y/o desacilación
A. Escobar, L. Sánchez, D. Cánovas, E. Mellado, A. González, O. López, I. Maya, J.M. Fernández- Bolaños

Patente española P201400374 (2014)

“Bacterial strains and their use in acylation and/or deacylation reactions”

Solicitud internacional en virtud del Tratado de Cooperación de Patentes (PCT) PCT/ES2015/000062 (2015)

“Lo esencial es invisible para los ojos” “Es el tiempo que has perdido por tu rosa lo que hace a la rosa tan importante” (Antoine de Saint-Exupéry “El Principito”)

A mi familia

A mi abuela

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, mi mayor agradecimiento a los Doctores Encarnación Mellado Duran y David Cánovas López por su confianza, apoyo y dirección durante el desarrollo de esta Tesis doctoral, sin su paciencia y sus consejos no habría sido posible la finalización de este trabajo ni el aprendizaje que para mí ha conllevado la realización del mismo.

En segundo lugar, agradecer a la junta de Andalucía por la financiación recibida.

Agradecer al Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis de Sevilla por su amabilidad al permitirnos el uso de sus instalaciones para la purificación de proteínas, en especial al técnico del Servicio de Cromatografía, Carlos Alberto Parejo Pérez, por su ayuda en el uso del FPLC.

Me gustaría agradecer también al Doctor Carlos Luna Durán y en general al Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Córdoba, su colaboración en la realización de los análisis cromatográficos y su amabilidad a la hora de explicarme todo lo que he necesitado sobre el Biodiésel.

Al Dr. Miguel Arévalo Rodríguez y a Juan Carlos Martínez Reyes, de la empresa Biomedal, por su ayuda en la sobreexpresión de proteínas.

Agradecer a mis compañeros y amigos del Departamento de Genética, Ana, María, Leyre, Isidro, Nacho, Leandro, Violeta, Eugenio, Ani, Ale y María del Mar, por su ayuda en lo relacionado a la ciencia y por su compañía y amistad, que me hacen recordar con cariño hasta los momentos más difíciles de estos años de doctorado.

Por último, deseo expresar mi agradecimiento a mi pareja y a mi familia por su apoyo incondicional a lo largo de este trayecto, ofreciéndome su cariño y comprensión siempre que lo he necesitado, en especial, a mi abuela, que vivió con orgullo el inicio y desarrollo de este trabajo sin poder presenciar su final.

Muchas gracias a todos

ÍNDICE

1. RESUMEN	3
2. OBJETIVOS	9
3. CAPÍTULO I	13
3.1. INTRODUCCIÓN	13
3.1.1. Biodiésel: Producción y enfoque actual	13
3.1.2. Lipasas	19
3.1.2.1. Lipasas: características generales	19
3.1.2.2. Mecanismo de acción de las lipasas	21
3.1.2.3. Condiciones óptimas de actuación de las lipasas	26
3.1.2.4. Clasificación de las enzimas lipolíticas bacterianas	27
3.1.2.5. Lipasas como catalizadores en la producción de Biodiésel	32
3.1.3. Tecnologías de producción de Biodiésel que integran el glicerol	37
3.1.3.1. Método del dimetil carbonato	38
3.1.3.2. Método del acetato de metilo y acetato de etilo	39
3.1.3.3. Producción de Biodiésel con lipasas 1,3-regioespecíficas	40
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	45
3.2.1. Material biológico	45
3.2.1.1. Cepas bacterianas.....	45
3.2.1.2. Plásmidos	45
3.2.1.3. Conservación de las cepas	47
3.2.2. Medios y condiciones de cultivos	47
3.2.2.1. Medios de cultivo para la selección de organismos lipolíticos	47
3.2.2.2. Análisis de las actividades hidrolíticas	49
3.2.2.3. Medios para el crecimiento de las cepas de <i>E. coli</i>	49
3.2.3. Compuestos antimicrobianos	50
3.2.4. Procesamiento de las muestras de suelo	50
3.2.5. Extracción, manipulación y purificación de ADN	51
3.2.5.1. Extracción y purificación de ADN	51
3.2.5.2. Manipulación del ADN	53
3.2.5.3. Secuenciación y análisis del ADN	61
3.2.6. Extracción y análisis de ARN	63
3.2.6.1. Extracción de ARN	63

3.2.6.2. Análisis del ARN.....	64
3.2.6.3. Análisis del ARN por RT-qPCR.....	64
3.2.7. Obtención de fracciones celulares bacterianas	66
3.2.8. Ensayos de actividad lipolítica	67
3.2.8.1. Aislamiento de microorganismos con actividad lipolítica (hidrólisis de tributirina en placa)	67
3.2.8.2. Ensayo de actividad hidrolítica con MUF-Butirato (zimograma y placa multipocillo)	67
3.2.8.3. Ensayo de actividad transesterificadora usando <i>para</i> -nitrofenol palmitato (<i>p</i> -NPP)	68
3.2.8.4. Ensayo de actividad hidrolítica del <i>p</i> -NPP	71
3.2.8.5. Determinación de la concentración de proteínas	72
3.2.9. Análisis del Biodiésel	73
3.2.9.1. Producción de Biodiésel a escala de laboratorio, cinética y reutilización	73
3.2.9.2. Cromatografía de gases (CG)	74
3.2.9.3. Determinación de la viscosidad.....	75
3.2.10. Ensayo <i>in vitro</i> de producción de proteínas.....	76
3.2.11. Sobreexpresión de las lipasas/esterasas candidatas a partir de <i>E. coli</i> BIVU111	78
3.2.12. Purificación de las lipasas/esterasas con actividad transesterificadoras a partir de <i>Terribacillus</i> sp. AE2B 122.....	79
3.2.13. Análisis de proteínas	81
3.2.13.1. Electroforesis desnaturizante de proteínas (SDS-PAGE)	81
3.2.13.2. Tinción de proteínas en geles de acrilamida.....	83
3.3. RESULTADOS	87
3.3.1. Selección y caracterización de microorganismos productores de Biodiésel	87
3.3.1.1. Zona de muestreo y análisis	87
3.3.1.2. Primer paso de la selección: aislamiento de microorganismos con actividad lipolítica (hidrólisis)	90
3.3.1.3. Segundo paso de selección: análisis de la actividad transesterificadora en las bacterias lipolíticas aisladas.....	91
3.3.1.4. Tercer paso del método de selección: selección de sobrenadantes bacterianos capaces de producir Biodiésel a escala de laboratorio	92
3.3.1.5. Medidas de la viscosidad	98
3.3.1.6. Análisis filogenético de las bacterias productoras de Biodiésel.....	99
3.3.1.7. Caracterización de las actividades hidrolíticas de las bacterias productoras de Biodiésel	103
3.3.2. Estrategias para la identificación y aislamiento de los genes y proteínas responsables de la actividad transesterificadora de <i>Terribacillus</i> sp. AE2B 122	105

3.3.2.1. Estrategia 1. Secuenciación y análisis bioinformático del genoma de <i>Terribacillus</i> sp. AE2B 122	105
3.3.2.2. Estrategia 2. Análisis del secretoma de <i>Terribacillus</i> sp. AE2B 122	110
3.3.2.3. Estrategia 3. Análisis de la expresión de las 8 lipasas/esterasas candidatas por RT-qPCR.....	112
3.3.2.4. Estrategia 4. Producción <i>in vitro</i> de las lipasas candidatas y comprobación de su actividad transesterificadora	115
3.3.2.5. Estrategia 5. Sobreexpresión de las lipasas candidatas de <i>Terribacillus</i> sp. AE2B 122 en <i>E. coli</i> BIVU111	117
3.3.2.6. Estrategia 6. Purificación de la proteína responsable de la actividad transesterificadora a partir del sobrenadante del cultivo de <i>Terribacillus</i> sp. AE2B 122.....	125
3.4. DISCUSIÓN	143
3.4.1. Selección y caracterización de cepas productoras de Biodiésel	143
3.4.2. Identificación de las proteínas responsables de la actividad transesterificadora de <i>Terribacillus</i> sp. AE2B 122. Análisis genéticos	152
4. CAPÍTULO II	163
4.1. INTRODUCCIÓN	163
4.1.1. Género <i>Terribacillus</i>.....	163
4.1.2. Resistencia a metales	164
4.1.2.1. Resistencia a arsénico	164
4.1.2.2. Homeostasis de metales esenciales (cobalto, zinc, cadmio y cobre)	170
4.1.2.3. Resistencia a cromo	174
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS	181
4.2.1. Material biológico	181
4.2.1.1. Cepas bacterianas.....	181
4.2.1.2. Plásmidos	181
4.2.2. Medios y condiciones de cultivo.....	182
4.2.2.1. Medios para el estudio de resistencia a metales en medio líquido	183
4.2.2.2. Medios para el crecimiento de las cepas de <i>E. coli</i>	183
4.2.3. Compuestos antimicrobianos	184
4.2.4. Extracción, manipulación y purificación de ADN.....	184
4.2.4.1. Cebadores para amplificación por PCR	185
4.2.5. Complementación heteróloga de <i>E. coli</i> AW3110 con los genes <i>ars</i> de <i>Terribacillus</i> sp. AE2B 122.....	186
4.2.6. Extracción y análisis del ARN	189
4.3. RESULTADOS.....	193

4.3.1. Caracterización de la resistencia a metales de <i>Terribacillus</i> sp. AE2B 122.....	193
4.3.2. Análisis de la resistencia a metales en medio líquido de <i>Terribacillus</i> sp. AE2B 122 .	199
4.3.3. RT-qPCR de los genes de resistencia a arsénico de <i>Terribacillus</i> sp. AE2B 122.....	203
4.3.4. Expresión heteróloga de los genes <i>ars</i> de <i>Terribacillus</i> sp. AE2B 122 en <i>E. coli</i>	205
4.4. DISCUSIÓN	215
5. CONCLUSIONES	225
6. BIBLIOGRAFÍA	229

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

A: Adenina

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

AE1B: Almazara Écija Balsa 1

AE2B: Almazara Écija Balsa 2

AEA: Almazara Écija Alpechín

AEDH: Almazara Écija Deshidratado de Hojas

Aio/ Aox/Aro/Aso: Nomenclaturas de genes de arsenito oxidasas

Amp^R: Resistencia a ampicilina

ARN: Ácido Ribonucleico

ATP: Adenosina trifosfato (*Adenosin Tri-Phosphate*)

AZCL: Polisacáridos anclados a azurina (*Azurine-Crosslinked Polysaccharides*)

BSA: Albúmina de suero bovino (*Bovine Serum Albumin*)

C.E: Conductividad Electrónica

CAT: Cloranfenicol Acetil Transferasa

Ce: Coeficiente de extinción molar

CE: Control de fracción extracelular

CEM: Cromatografía de Exclusión Molecular

CG: Cromatografía de Gases

CI: Control de fracción intracelular

CIH: Cromatografía de Interacción Hidrofóbica

Cm^R: Resistencia a Cloranfenicol

Cpf: Concentración de proteína en la fracción celular

Cps: Concentración de proteína soluble

cSt: Centistokes

DDBJ: Base de datos japonesa de ADN (*DNA Data Bank of Japan*)

DG: Diglicérido

DGMC: Diglicéridos Metil Carbonato

DMA: Dimetil-Arsina

DMAA: Dimetil Arsenito y Arseniato

DMA-III: Dimetil Arsenito

DMA-V: Dimetil Arseniato

DO: Densidad Óptica

E-acil: Intermediario acil-Enzima

EMBL: Laboratorio europeo de biología molecular (*European Molecular Biology Laboratory*)

ES: Complejo Enzima-Sustrato

EXPASY: Sistema de análisis de proteínas (*Expert Protein Analysis System*)

FAE: Éster de ácidos grasos (*Fatty Acid Ester*)

FAEE: Éster etílico de ácidos grasos (*Fatty Acid Ethyl Ester*)

FAME: Éster metílico de ácidos grasos (*Fatty Acid Methyl Ester*)

fd: Factor de dilución

FID: Detector de ionización por llama (*Flame Ionization Detector*)

FPLC: Cromatografía líquida rápida de proteína (*Fast Protein Liquid Chromatography*)

Glu: Glucosa

Gm^R: Resistencia a gentamicina

GSH: Glutation reducido

gyrA: Subunidad A de la girasa

HMA: Dominio asociado a metales pesados (*Heavy Metal Associated domain*)

I.D: Diámetro interno (*Internal Diameter*)

IEA: Agencia internacional de la energía (*International Energy Agency*)

INIBIC: Instituto de investigación biomédica

IPTG: Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido

K: Grado kelvin

Kb: Kilobase

KDa: Kilodaltons

LB: Medio de cultivo Luria Bertani

LBT: Medio LB adicionado con tributirina

M.O: Materia Orgánica

Mb: Megabases

MG: Monoglicérido

MGDMC: Monoglicérido Dimetil Carbonato

min: Minuto

MMA: Metil arsenito

MPa: Megapascales

Nal^R: Resistencia a ácido Nalidíxico

NCBI: Centro nacional de información biotecnológica (*National Center for Biotechnology Information*)

NGS: Secuenciación de última generación (*Next Generation Sequencing*)

°C: Grados centígrados

OCDE: Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico

ORF: Marco abierto de lectura (*Open Reading Frame*)

p/v: Peso/volumen

PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida (*Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

pBC: Plásmido pBlueScript

pbs: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

PDB: Medio de cultivo de patata y dextrosa (*Potato Dextrose Broth*)

PEG: Polietilén Glicol

Pi: Fosfato inorgánico

PLA2: Fosfolipasa A2

p/lac: Promotor del operón *lac*

PLPs: Proteínas semejantes a la patatina (*Patatine Like Proteins*)

p-NP: *Para*-nitrofenol (*p-Nitrophenol*)

p-NPP: *Para*-nitrofenol palmitato (*p-Nitrophenol Palmitate*)

PPL: Lipasa pancreática porcina (*Pancreatic Porcine Lipase*)

PSA: Persulfato Amónico

PYAT: Medio PYA adicionado con tributirina

RAST: Servidor de anotación rápida (*Rapid Annotation Server*)

RBS: Sitio de unión del ribosoma (*Ribosomal Binding Site*)

RDB: Base de datos del ARN ribosomal (*Ribosomal Database*)

RND: Resistencia-Nodulación-División

rpm: Revoluciones por minuto

rpoB: Subunidad β de la ARN polimerasa bacteriana

RT: Retrotranscripción

RT-qPCR: Retrotranscripción-PCR cuantitativa

SA: Sulfato de Amonio

SAM: S-Adenonil Metionina

SDS: Dodecilsulfato sódico (*Sodium Dodecyl Sulfate*)

seg: Segundo

SOAP: Protocolo de acceso de objeto simple (*Simple Object Access Protocol*)

Spl: Péptido señal para la peptidasa señal I

TAE: Tris-Ácido acético glacial-EDTA

TB: Medio de cultivo (*Terrific Broth*)

Tc^R: Resistencia a tetraciclina

TE: Tris-EDTA

Tel: Lipasa de *Terribacillus*

TEMED: Tetrametiletilenodiamida

TG: Triglicérido

Tm: Temperatura de fusión (*Temperature of Melting*)

TMAO: Óxido de trimetil arsina (*Tri-Methyl Arsine Oxide*)

TPK: Tampón fosfato potásico

TR: Tiempo de retención

TS: Estado de transición (*Transition State*)

UA1: Primera unificación

UA2: Segunda unificación

UA3: Tercera unificación

UA4: Cuarta unificación

UV: Ultravioleta

v/v: Volumen/volumen

v: Viscosidad cinemática

VC: Volumen de columna

Vf: Volumen de fracción celular

Vt: Volumen total

XGal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

YPD: Medio de cultivo extracto de levadura-peptona-dextrosa (*Yeast extract- Peptone-Dextrose*)



1. RESUMEN



1. RESUMEN

La búsqueda de nuevas fuentes de energías alternativas, sostenibles y renovables se ha convertido en un área de investigación de gran importancia en los últimos años, debido, entre otras razones, a la previsión de que el petróleo se agote en las próximas décadas. En este sentido, el Biodiésel es una alternativa prometedora al gasóleo, debido a una serie de ventajas respecto al Diésel derivado del petróleo. Actualmente el proceso de producción de Biodiésel que se utiliza a nivel industrial es la metanólisis de aceites (transesterificación) utilizando catalizadores alcalinos (KOH y NaOH). Este proceso de producción no es económicamente rentable, lo que ha llevado a que el desarrollo de nuevas tecnologías alternativas para la producción de Biodiésel, innovadoras, competitivas y respetuosas con el medio ambiente constituya uno de los principales objetivos de los últimos trabajos de investigación. Una de las líneas de investigación más importantes en esta área consiste en el uso de lipasas para la producción de Biodiésel, permitiendo que la “biotecnología enzimática blanca” se introduzca en el sector industrial energético.

En este contexto, la primera parte de este trabajo de Tesis Doctoral se centra en la utilización de las lipasas como catalizadores en la producción de Biodiésel, debido a la capacidad de estas enzimas para realizar reacciones de transesterificación de aceites en medios no acuosos. Siguiendo esta línea, se desarrolló un método rápido para la selección de microorganismos productores de Biodiésel en una almazara de Écija, basándonos tanto en sus actividades hidrolíticas como en sus actividades transesterificadoras. De los 1.016 microorganismos analizados, dos bacterias presentaron los mejores rendimientos en la producción de ésteres de ácidos grasos (FAEs) tras la transesterificación de aceite de girasol. Estas bacterias resultaron pertenecer al mismo género, el género *Terribacillus*, el cual nunca antes había sido descrito como productor de Biodiésel. Así, se seleccionó una de estas cepas, *Terribacillus* sp. AE2B 122, para posteriores análisis genéticos y bioquímicos. Adicionalmente, se comprobó mediante cromatografía de gases que el producto de la transesterificación, usando los microorganismos analizados, difería del Biodiésel convencional, ya que integraba el glicerol en su composición como MG, lo que podría simplificar el procesamiento de este Biofuel.

Se obtuvo la secuencia completa del genoma de *Terribacillus* sp. AE2B 122 y tras el análisis bioinformático de este genoma se identificaron 8 lipasas/esterasas. De ellas, Tel7 es la única de las candidatas que ha mostrado cierta actividad transesterificadora frente a *para*-nitrofenol palmitato (*p*-NPP).

El uso de microorganismos en la biorremediación de metales pesados constituye otro área de gran interés en biotecnología ambiental. Siguiendo la línea de este trabajo en cuanto a la búsqueda de nuevas actividades de microorganismos de interés ambiental de esta tesis, la segunda parte se desarrolla en el contexto de la contaminación ambiental por metales pesados.

En primer lugar, se realizó el estudio *in silico* de los genes presentes en el genoma de *Terribacillus* sp. AE2B 122 relacionados con la resistencia a metales pesados y metaloides, utilizando las herramientas bioinformáticas (BLAST y EXPASY). Además, se realizaron ensayos de resistencia de la bacteria a estos metales en medio líquido. De los metales analizados, nos centramos en el estudio de la resistencia a arsénico al comprobar que *Terribacillus* sp. AE2B 122 exhibía una disposición singular de los homólogos a los genes responsables de la resistencia a este metal en su genoma. Los genes de resistencia a arsénico suelen co-transcribirse formando un operón, siendo generalmente la combinación mínima de genes *arsRBC* (ej.: *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus*). En el caso de *Terribacillus* sp. AE2B 122, el gen homólogo para la reductasa de As(V) *arsC*, no se localiza en el genoma junto a ninguno de los otros genes responsables de la resistencia a arsénico (*arsB* y *arsR*). Mediante RT-qPCR se pudo demostrar que la expresión de uno de los genes homólogos a *arsB* y uno de los homólogos a *arsR*, que se localizan contiguos en el genoma de la bacteria, era inducible por As(V). Además, se llevaron a cabo estudios de complementación heteróloga del mutante *E. coli* AW3110 (Δ *arsRBC::cam*) con los genes homólogos a *arsB* y *arsC* de *Terribacillus* sp. AE2B 122 y se comprobó que la sensibilidad a As(III) del mutante se complementaba con uno de los genes homólogos de la bomba de As(III) *arsB*. La complementación de la sensibilidad a As(V) de *E. coli* AW3110 no fue tan clara, pudiendo deberse a que ninguna de las enzimas reductasas analizadas funcionen como tal, lo que podría significar que la resistencia a As(V) de la bacteria estudiada se deba a otro mecanismo de resistencia no relacionado con la

reducción, como la eliminación directa del As(V) sin reducir, su unión a glutatión o chaperonas en el espacio intracelular o respuesta a estrés oxidativo.

ገጽ

2. OBJETIVOS

ገጽ

2. OBJETIVOS

Ante la previsión de que el petróleo se agote en las próximas décadas, la Comisión Europea ha indicado como uno de los objetivos fundamentales para los próximos años reducir la utilización del petróleo mediante la introducción de energías alternativas renovables y de menor impacto ambiental. En este sentido, el Biodiésel es uno de los biocarburantes que constituye una alternativa prometedora al gasóleo, puesto que tiene una serie de ventajas respecto al Diésel derivado del petróleo y además, puede ser utilizado en cualquier motor Diésel, sin que sea necesario ningún tipo de modificación con un rendimiento energético similar.

Actualmente, el proceso que se realiza a nivel industrial para la producción de Biodiésel es una metanólisis química de aceites utilizando catalizadores alcalinos (KOH y NaOH) que conlleva varios inconvenientes de difícil solución.

Por este motivo, el desarrollo de nuevas tecnologías alternativas para la producción de Biodiésel ha cobrado importancia. La principal línea alternativa consiste en el desarrollo de procesos biocatalíticos. La primera parte de este trabajo aborda la utilización de bacterias lipolíticas en la producción de este combustible.

La segunda parte de este trabajo de Tesis Doctoral, se desarrolla en el contexto de otro problema medioambiental actual, la contaminación por metales pesados y el uso de microorganismos en la biorremediación. Las principales fuentes de contaminación por metales son o bien naturales (manantiales termales, zonas volcánicas y mineras...etc) o bien como consecuencia de la actividad humana (minería, industria, pesticidas, agricultura...etc).

Los iones de los metales pesados y los metaloides pueden ser muy tóxicos para las células, mediante su unión a proteínas esenciales de la cadena respiratoria, daño oxidativo debido a la producción de especies reactivas de oxígeno, o mediante daño directo al ADN. Debido a esto, muchos microorganismos han desarrollado mecanismos de resistencia a estos metales mediante mecanismos de absorción, quelación y/o transporte.

Por tanto, este trabajo de investigación busca contribuir a paliar los efectos medioambientales causados por la actividad industrial, en concreto, para el desarrollo de este trabajo se han establecido tres objetivos específicos:

1. Selección de bacterias con capacidad de producción de Biodiésel, incluyendo la caracterización de aquellas cepas más prometedoras para su utilización industrial.
2. Caracterización de las proteínas responsables de la actividad transesterificadora de la cepa más prometedora, *Terribacillus* sp. AE2B 122.
3. Caracterización de la resistencia a metales pesados de *Terribacillus* sp. AE2B 122.

Los dos primeros objetivos se engloban en el Capítulo 1 y el último se aborda en el Capítulo 2.



3. CAPÍTULO 1

3.1. INTRODUCCIÓN



3. CAPÍTULO I. Producción de Biodiésel usando lipasas

3.1. INTRODUCCIÓN

3.1.1. Biodiésel: Producción y enfoque actual

La búsqueda de nuevas fuentes de energías alternativas, sostenibles y renovables se ha convertido en un área de investigación de gran importancia en los últimos años, debido, entre otras razones, a la previsión de que el petróleo se agote en las próximas décadas. En este sentido, el Biodiésel es una alternativa prometedora al gasóleo, debido a una serie de ventajas respecto al Diésel derivado del petróleo y a que puede ser utilizado en cualquier motor Diésel, sin necesidad de ningún tipo de modificación, con un rendimiento energético similar (Atabani y col., 2012; Ranganathan y col., 2008; Zhang y col., 2012).

El Biodiésel es una mezcla de monoalquil ésteres obtenidos tras el procesamiento de aceites vegetales, animales, de algas o de aceites de desecho, debido a que los aceites no se pueden usar directamente en los motores Diésel por los siguientes inconvenientes:

- 1- Su alta viscosidad.
- 2- Su baja estabilidad contra la oxidación, con las consecuentes reacciones de polimerización.
- 3- La baja volatilidad, que da lugar a una combustión incompleta, y que a su vez provoca la formación de grandes cantidades de cenizas.

Por estos motivos se han realizado grandes esfuerzos para el desarrollo de derivados de aceites vegetales, cuyas propiedades se aproximan al Diésel derivado del petróleo. El mejor ejemplo de estos derivados es el Biodiésel (Tabla 1) (Bajpai & Tyagi, 2006; Yusuf y col., 2011). El Biodiésel es un líquido de color amarillo ámbar, tiene una viscosidad parecida al Diésel convencional, no es inflamable y, a diferencia de éste, no es explosivo, con un punto de inflamación de 423 K comparado con el del Diésel del petróleo que es de 344 K. Además el Biodiésel es biodegradable, no es tóxico, y sus emisiones son menores durante la combustión.

Tabla 1. Propiedades químicas y físicas del Biodiésel y Diésel

Propiedades	Biodiésel	Diésel
Fórmula química (rango)	(M)etil ésteres C ₁₄ – C ₂₄ o C ₁₅₋₂₅ H ₂₈₋₄₈ O ₂	Hidrocarburo C ₁₀ -C ₂₁
Rango de viscosidad cinemática (mm²/s, a 313 K)	3,3 - 5,2	1,9 – 4,1
Rango de densidad (kg/m³, a 288 K)	860 - 894	840-870
Punto de ebullición (K)	>457	>463
Rango del punto de inflamación (K)	366 - 450	327 - 344
Rango de destilación (K)	470 - 600	<633
Apariencia física	De amarillo claro a oscuro, líquido claro	Claro y brillante
Biodegradabilidad	Más degradable que el Diésel derivado del petróleo	Menos degradable que el Biodiésel
Reactividad	Estable, pero hay que evitar el contacto con agentes oxidantes fuertes	Menos propenso a la oxidación

Según estimaciones de las estadísticas actualizadas de *Oil World*, en el año 2013 los países que se consideran mayores productores de Biodiésel fueron USA y Alemania. Argentina, que desde 2010 a 2012 era el tercer mayor productor de Biodiésel, descendió por debajo de USA, Alemania, Indonesia y Brasil en los últimos dos años (Tabla 2).

Tabla 2. Principales países productores de Biodiésel en los últimos años

País	2010	2011	2012	2013	2014 (estimado)
Producción mundial de biodiésel	18,37	22,31	24,19	27,06	29,12
USA	1,14	3,22	3,3	4,53	4,3
Indonesia	0,68	1,38	1,99	2,63	3,8
Brasil	2,1	2,35	2,39	2,56	3
Alemania	2,8	2,79	2,63	2,7	2,75
Argentina	1,82	2,43	2,46	2	2,05
Tailandia	0,65	0,79	0,92	0,95	1
Holanda	0,36	0,48	0,8	0,98	1

*Datos expresados en miles de millones de litros y obtenidos de *Oil World*

Para la producción de Biodiésel existen tres métodos bien establecidos, microemulsión, pirólisis y transesterificación, siendo este último el más utilizado. De hecho, actualmente el proceso de producción que se utiliza a nivel industrial es la catálisis básica homogénea, una metanólisis de aceites (transesterificación) utilizando catalizadores alcalinos (KOH y NaOH). El proceso se lleva a cabo tanto en continuo como en discontinuo (Aransiola y col., 2014; Zhang y col., 2003).

La transesterificación usando catálisis básica homogénea consiste en el uso del catalizador en forma líquida, mezclándolo previamente con el alcohol, que conlleva la creación de un alcóxido nucleofílico (Figura 1) que ataca la parte electrofílica del grupo carbonilo del triglicérido. La ruptura del triglicérido se produce en tres pasos (Figura 2):

- 1- Formación del intermediario tetraédrico.
- 2- Ruptura del intermediario tetraédrico en un diglicérido y un éster de ácido graso.
- 3- Recuperación del catalizador por transferencia de protones.

Este proceso se repite cada vez que se produce la ruptura de un enlace éster del triglicérido para dar lugar a la formación final de tres moléculas de ésteres de ácidos grasos y una de glicerol (Figura 3) (Aransiola y col., 2014).

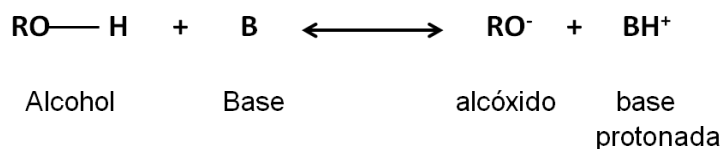


Figura 1. Mezcla del catalizador básico y del alcohol para la formación del alcóxido

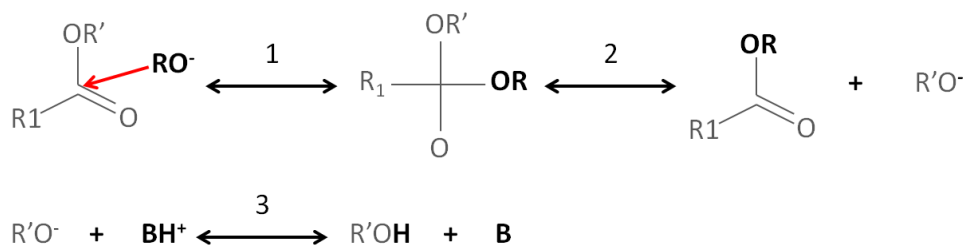


Figura 2. Ruptura de un enlace éster del triglicérido en la transesterificación

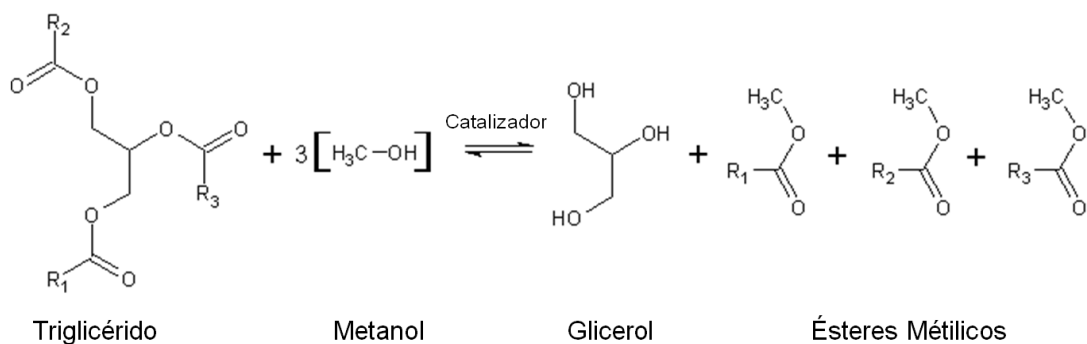


Figura 3. Ecuación global de la transesterificación de un triglicérido con metanol

El alcohol es el aceptor acilo más utilizado en la transesterificación, sobre todo el metanol, y en menor medida el etanol. También se pueden utilizar otros alcoholes, como por ejemplo, propanol, butanol, 2-propanol, alcohol *tert*-butílico, alcoholes ramificados y octanol, pero los costes son mucho mayores.

En cuanto a la selección del aceptor acilo más favorable hay que tener en cuenta que el metanol es más barato, más reactivo y los ésteres metílicos de ácidos grasos formados (FAME) son más volátiles que los correspondientes ésteres etílicos (FAEE). Sin embargo el etanol es menos tóxico y es considerado un compuesto más ecológico, debido a que puede ser fácilmente producido a partir de fuentes renovables por fermentación. En cuanto a sus características como combustible, sólo se encuentran pequeñas diferencias entre FAMEs y FAEEs, como por ejemplo, que los FAEEs tienen viscosidades ligeramente mayores, puntos de detonación y combustión mayores, puntos de enturbamiento y de fluencia ligeramente menores, y menor opacidad del humo producido. El átomo extra de carbono en los ésteres etílicos aumenta el contenido calórico y el número de cetano (Modi y col., 2007; Ognjanovic y col., 2009; Yusuf y col., 2011).

Debemos indicar que la metanólisis química a nivel industrial conlleva varios inconvenientes técnicos, como el elevado consumo de energía y además que el producto secundario que se genera, el glicerol, se contamina con el catalizador impidiendo su utilización posterior. Otro problema es que la utilización de álcalis como catalizadores implica que el alcohol y los glicéridos tienen que ser anhidros para evitar reacciones de saponificación. Debe evitarse que se produzcan reacciones de neutralización de ácidos grasos libres (Atabani y col., 2012; Basri y col., 1997; Fukuda y col., 2001). Además, la metanólisis química también conlleva una serie de desventajas económicas:

- 1- El alto coste y la limitada disponibilidad de la materia prima, en comparación con el precio del crudo de petróleo. Se estima que el costo de la materia prima supone un 75% del coste total de la producción de Biodiésel.
- 2- El costo del procesamiento del aceite hasta la obtención del Biodiésel, existiendo dos aspectos a considerar:
 - a. Los costes del proceso de transesterificación.
 - b. Los costes de recuperación del subproducto glicerol.

Así, se trabaja en la utilización de aceite no comestible como materia prima, como el aceite de algas, que pueda abaratar el proceso y no encarezca los productos de alimentación de primera necesidad (Aransiola y col., 2014).

Los costes de procesamiento podrían mejorarse utilizando un proceso de transesterificación continuo, el cual aumentaría la capacidad de producción y disminuiría los tiempos de reacción. Con respecto al glicerol, las soluciones podrían ser la obtención de glicerol de alta calidad, o la incorporación del mismo en el Biodiésel (Singh & Singh, 2010).

Según la Agencia Internacional de la Energía [*International Energy Agency*, (IEA)], el Biodiésel producido mediante la tecnología actual en los países de la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE), es aún de dos a tres veces más caro que la gasolina y el Diésel. Por tanto, actualmente el Biodiésel obtenido por metanólisis química no es económicamente rentable, lo que ha llevado a que el desarrollo de nuevas tecnologías alternativas para la producción de Biodiésel, innovadoras, competitivas y respetuosas con el medio ambiente constituya una línea de investigación muy interesante. Ejemplos de estas alternativas son: el uso del aceite de microalgas, aceites usados y otros aceites no comestibles, que eviten la competencia con el consumo en alimentación; y el uso de la destilación reactiva, la cual unifica el proceso de producción y separación en un único paso (Aransiola y col., 2014; Atabani y col., 2012). Otra de las líneas de investigación más importantes consiste en el desarrollo de procesos biocatalíticos, como el uso de lipasas para la transesterificación, permitiendo que la “biotecnología enzimática blanca” se introduzca en el sector industrial energético. La aceptación del protocolo de Kyoto y de mecanismos de desarrollo limpios podría llevar a una mayor producción de Biodiésel en todo el mundo.

El Biodiésel puede ser más efectivo si se usa como complemento a otras fuentes de energía (Atabani y col., 2012; Luna y col., 2013). Un ejemplo puede ser el uso de mezclas de Biodiésel y Diésel, como son las mezclas volumétricas B2, B5 y B20, con un 2%, 5% y 20% de Biodiésel, respectivamente. Las más utilizadas son las B5 y B20, no requiriéndose para las mezclas ninguna modificación en el motor Diésel (Yusuf y col., 2011).

Además, el uso de estas mezclas implica, según la Agencia Andaluza de la Energía, un ahorro energético en el vehículo que las utiliza y una disminución de las emisiones de CO₂ (Tabla 3).

Tabla 3. Ejemplo de ahorro energético en un vehículo que use la mezcla B20

Tipo de vehículo	Consumo medio (l/100km)	km anuales medidos	Ahorro energía primaria (tep*/año)	Emisiones CO ₂ evitadas (t/año)
Todo terreno	11	50.000	0,94	0,7
Furgoneta	11	50.000	0,94	0,7
Turismo	8	40.000	0,55	0,3
Camión	28	70.000	3,36	1,1

*Tep: tonelada equivalente de petróleo

Datos de la Agencia Andaluza de la Energía

3.1.2. Lipasas

3.1.2.1. Lipasas: características generales

El grupo de las enzimas lipolíticas incluye carboxilesterasas (EC 3.1.1.1) y lipasas verdaderas (EC 3.1.1.3). Las carboxilesterasas actúan sobre pequeños ésteres solubles en agua y su cinética podría ser descrita por la ecuación de Michaelis-Menten (Brockerhoff & Jensen, 1974; Sarda & Desnuelle, 1958); sin embargo, las lipasas verdaderas, glicerol-éster hidrolasas (EC 3.1.1.3), pertenecientes a la familia hidrolasas de serina, catalizan la hidrólisis de los enlaces éster del glicerol con ácidos grasos de cadena larga, que son a menudo insolubles en agua, es decir, llevan a cabo la hidrólisis de grasas y aceites con la consiguiente liberación de los ácidos grasos, diglicéridos, monoglicéridos y glicerol. Además pueden realizar otras reacciones de hidrólisis y síntesis de un amplio grupo de ésteres carboxílicos (González-Bacero y col., 2010; Kapoor & Gupta, 2012).

Las lipasas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, estando presentes en microorganismos, plantas y animales. Su interés creciente en la industria se debe a su versatilidad, estereoselectividad, estabilidad frente a disolventes orgánicos y su capacidad para sintetizar compuestos orgánicos en mezclas de reacción con baja actividad de agua. Bajo ciertas condiciones pueden realizar distintas reacciones, como son la esterificación, interesterificación, alcoholisis, acidólisis, aminolisis e hidrólisis de carbonatos orgánicos.

La reacción que una lipasa cataliza depende fundamentalmente de la cantidad de agua en el medio de reacción. La reacción de hidrólisis ocurre principalmente en la interfase agua/disolvente orgánico. La ausencia de agua evita que se produzca reacción de hidrólisis, existiendo varios trabajos donde se describen lipasas que catalizan reacciones de síntesis en medios no acuosos (disolventes orgánicos y fluidos supercríticos) o con baja cantidad de agua (Kapoor & Gupta, 2012; Stergiou y col., 2013).

Las lipasas se han utilizado ampliamente en la industria alimentaria, papelera, química y energética, en la producción de detergentes, de cosméticos, en tratamientos ambientales, diseño de biosensores, producción de fármacos más selectivos y efectivos y producción de pesticidas de menor toxicidad. Además, las lipasas son también de gran interés industrial debido a que realizan reacciones de esterificación, interesterificación y transesterificación, como por ejemplo, para la producción de Biodiésel (González-Bacero y col., 2010; Stergiou y col., 2013).

La mayoría de las lipasas presentan un rango de masa molecular comprendido entre 27 y 60 kDa y puntos isoeléctricos entre 3,8 y 7,3 (Tabla 4).

Tabla 4. Masas moleculares y puntos isoeléctricos de lipasas de distintas procedencias

Fuente de las lipasas	Masa molecular (kDa)	Punto isoeléctrico
<i>Chromobacterium viscosum</i>	33	7,1
<i>Candida rugosa</i>	60	4,80-5,04 (isoenzimas)
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	32	7,3
<i>Rhizomucor miehei</i>	31.6	3,8
Salvado de arroz	9.4	ND
<i>Acinetobacter</i> sp.	33	ND
Escorpión (glándulas digestivas)	50	ND
Calamar <i>Todarodes pacificus</i> (hígado)	27	ND

*Datos obtenidos de González-Bacero y col. 2010

*ND: No determinado

3.1.2.2. Mecanismo de acción de las lipasas

La estructura tridimensional de muchas lipasas ha sido elucidada mediante cristalografía de Rayos X (Tabla 5) y gracias a esos estudios se ha podido estudiar su mecanismo de acción e identificar algunas características comunes de este grupo de enzimas, como por ejemplo su regioespecificidad (Kapoor & Gupta, 2012).

Tabla 5. Lipasas cuyas estructuras han sido determinadas mediante cristalografía de Rayos X y sus especificidades

	Fuente de la lipasa	Especificidad de la lipasa
Bacteria	<i>Bacillus thermocatenulatus</i>	1,3-Regioespecífica
	<i>Burkholderia glumae</i> (<i>Pseudomonas glumae</i>)	No específica
	<i>Burkholderia cepacia</i> (<i>Pseudomonas cepacia</i>)	No específica
	<i>Bacillus subtilis</i>	–
	<i>Chromobacterium viscosum</i>	No específica
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	No específica
Hongo	<i>Aspergillus niger</i>	1,3-Regioespecífica
	<i>Candida rugosa</i> (<i>Candida cylindracea</i>)	No específica
	<i>Candida antarctica</i> A	Trans-específica
	<i>Candida antarctica</i> B	1,3-Regioespecífica
	<i>Geotrichum candidum</i>	cis- Δ^9 (ácido graso insaturado)
	<i>Mucor javanicus</i>	1,3-Regioespecífica
	<i>Penicillium camembertii</i> (<i>Penicillium cyclopeum</i>)	1,3-Regioespecífica
	<i>Penicillium expansum</i>	–
	<i>Rhizomucor miehei</i> (<i>Mucor miehei</i>)	1,3-Regioespecífica
	<i>Rhizopus delemar</i>	1,3-Regioespecífica
	<i>Rhizopus oryzae</i>	1,3-Regioespecífica
	<i>Rhizopus niveus</i>	1,3-Regioespecífica
	<i>Thermomyces lanuginosa</i> (<i>Humicola lanuginosa</i>)	1,3-Regioespecífica
<i>Yarrowia lipolytica</i>	1,3-Regioespecífica	
Animal	<i>Canis lupus familiaris</i> (perro)	–
	<i>Equus caballus</i> (equino)	–
	Lipasa pancreática humana	1,3-Regioespecífica
	Lipasa pancreática porcina	1,3-Regioespecífica
	<i>Sus scrofa</i> (oso)	–

*Datos obtenidos de Kapoor & Gupta (2012)

Las lipasas pertenecen a la familia de hidrolasas con plegamiento α/β , presentando un dominio estructural canónico compuesto por ocho cadenas β paralelas, rodeadas y unidas por α -hélices, formando una hoja β (Figura 4) (Nardini & Dijkstra, 1999). La actividad funcional de las lipasas reside en la triada catalítica de aminoácidos: nucleófilo-ácido-histidina (Ser-Asp/Glu-His), la cual se ubica en zonas bien conservadas del dominio catalítico. El nucleófilo es generalmente serina y se encuentra normalmente en un giro que conecta una cadena β con una hélice α , en una secuencia pentapeptídica conservada Gly-X-Ser-X-Gly, formando así un motivo característico β -giro- α llamado “codo nucleofílico”. Las lipasas comparten este mismo, o al menos similar, patrón de plegamiento α/β -hidrolasa con las esterasas (González-Bacero y col., 2010; Kapoor & Gupta, 2012; Stergiou y col., 2013).

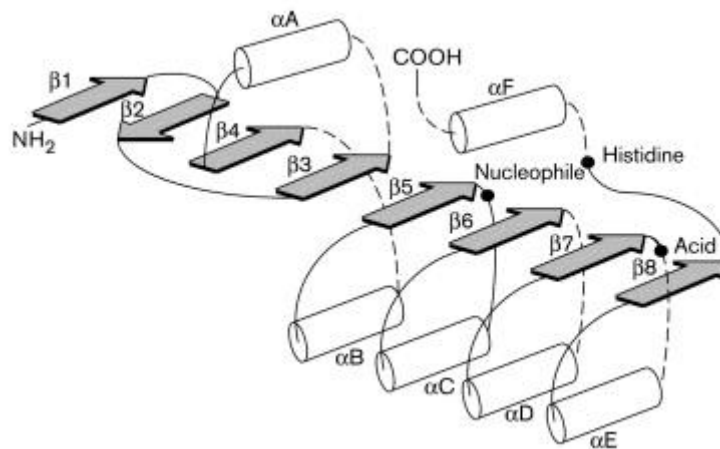


Figura 4. Estructura del dominio de las α/β hidrolasas. Las α -hélices y las cadenas β se representan mediante cilindros blancos y flechas grises, respectivamente. La localización de la triada catalítica se señala mediante puntos negros. Las líneas discontinuas indican la localización de posibles inserciones (Nardini & Dijkstra, 1999)

El centro activo de lipasas y esterasas es químicamente similar pero estructuralmente diferente. El grupo hidroxilo de la serina de las lipasas está orientado de manera diferente al de las esterasas y esto tiene como resultado una inversión estereoquímica de la triada catalítica, es decir se distribuyen espacialmente de manera inversa (Kapoor & Gupta, 2012).

La cinética de las lipasas verdaderas se caracteriza por seguir un patrón de curva sigmoidea (Brockerhoff & Jensen, 1974), debido a que el centro activo permanece tapado por una “cubierta” o “tapadera” que impide la entrada del sustrato, el cual sólo puede entrar cuando la enzima se encuentra en su conformación activa, es decir, cuando la cubierta se ha desplazado. Estas enzimas son solubles en agua, y actúan sobre sustratos insolubles y agregados, por lo que operan en interfases lípido-agua mostrando un mecanismo específico denominado de “activación interfacial” (Figura 5). A bajas concentraciones de sustrato la actividad enzimática es también baja; sin embargo, tan pronto como la concentración del sustrato aumenta hasta un punto donde comienza a formar agregados (concentración micelar crítica), se forma una interfase entre las micelas hidrofóbicas formadas por el sustrato y la fase acuosa (hidrofilica), donde están suspendidas las lipasas. Llegado a este punto, la actividad lipolítica aumenta rápidamente (González-Bacerio y col., 2010; Kapoor & Gupta, 2012). La cubierta puede ser una α -hélice anfifílica o un lazo. En el caso de *Geobacillus thermocatenuatus* la cubierta de la lipasa presenta una estructura compleja que involucra a un gran porcentaje de aminoácidos de la enzima formando una doble cubierta. Por el contrario, la lipasa B de *C. antarctica* tiene una cubierta muy simple y pequeña que no mantiene el centro activo totalmente tapado en la forma cerrada. La lipasa del cerdo guineano tiene una cubierta muy pequeña compuesta únicamente por 5 aminoácidos (González-Bacerio y col., 2010; Kapoor & Gupta, 2012; Stergiou y col., 2013).

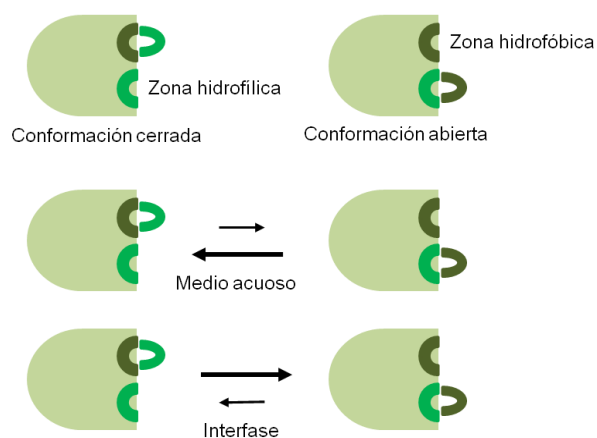


Figura 5. Mecanismo de activación interfacial de las lipasas

En su conformación activa el centro activo contiene una serie de residuos hidrofóbicos, de la región N-terminal y C-terminal de la lipasa, rodeando la serina catalítica y conformando una región electrofílica conocida como cavidad oxianiónica. En el centro activo hay una superficie significativamente apolar que se conoce como zona de contacto lipídico, donde se unen los ácidos grasos en tres huecos o posiciones distintas *sn-1*, *sn-2* y *sn-3*. También aparecen algunas moléculas de agua que ayudan a mantener una conformación catalíticamente competente del centro activo. Además del centro activo principal, hay lipasas como la pancreática humana y la porcina que presentan en su región C-terminal un segundo posible sitio catalítico. Este sitio podría ser el responsable de la actividad enzimática frente a sustratos hidrosolubles como los ésteres de *p*-nitrofenol (González-Bacero y col., 2010; Kapoor & Gupta, 2012).

Como ya se ha mencionado, las lipasas aumentan su actividad catalítica en interfases lípido-agua (activación interfacial). Esta interfase es una superficie imaginaria que separa dos porciones del espacio homogéneas y distintas físicamente. A nivel molecular la interfase es un conjunto de dos capas adyacentes de moléculas de distinto carácter hidrofóbico-hidrofílico. En el proceso de activación, el ambiente dieléctrico en la superficie proteica en la capa hidrofóbica de la interfase se modifica, potenciando las interacciones electrostáticas. Esta modificación permite un cambio de conformación en la molécula, haciendo que la cubierta del centro activo se desplace y forme la cavidad oxianiónica y la zona de contacto lipídico, aumentando todo esto la afinidad de la lipasa por su sustrato lipídico (Figura 6). El mecanismo de acción conlleva el ataque nucleofílico del grupo hidroxilo de la serina al carbono del enlace éster del sustrato. Esto resulta en la formación de un intermediario tetraédrico que seguidamente pierde una molécula de alcohol para dar lugar a un intermediario acil-enzima. En este momento, una molécula de agua ataca al complejo acil-enzima provocando que se libere finalmente una molécula de ácido, volviendo la enzima a su conformación nativa (Figura 6). Hay lipasas cuyas cubiertas no exhiben activación interfacial, como las lipasas de *P. glumae*, *Pseudomonas aeruginosa*, la lipasa B de *C. antarctica*, la lipasa pancreática del cerdo guineano y la lipasa pancreática del coipú (nutria). Otras como la lipasa de *Staphylococcus hyicus*, sólo muestran activación interfacial con algunos sustratos (González-Bacero y col., 2010; Kapoor & Gupta, 2012).

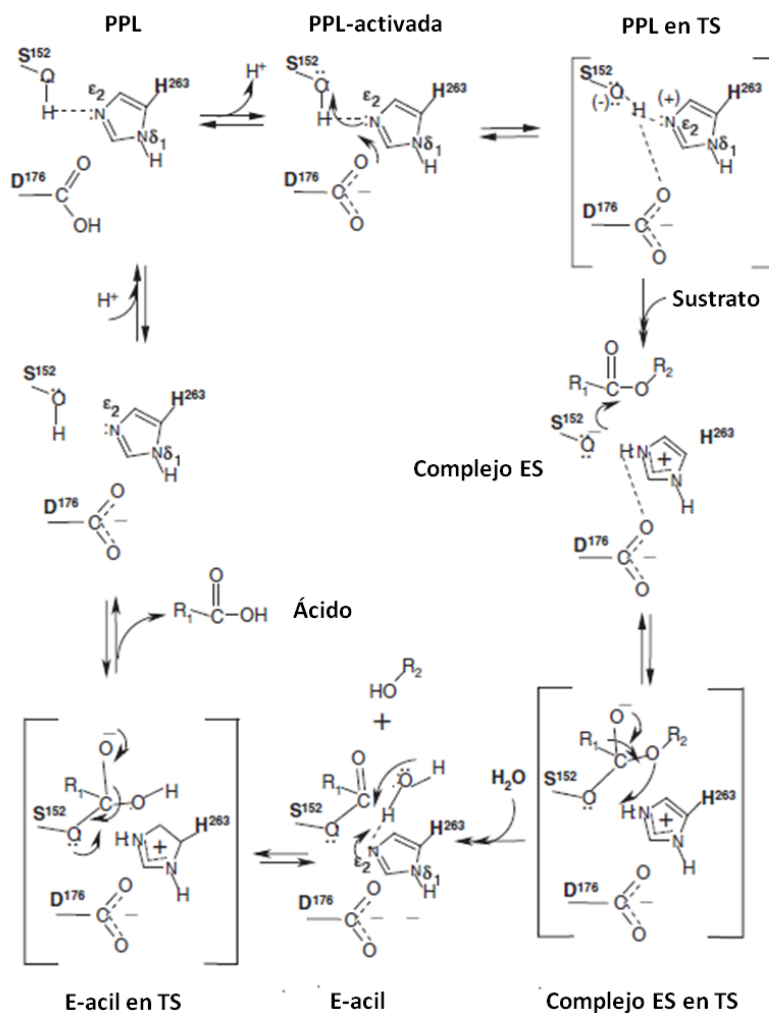


Figura 6. Mecanismo de acción de la lipasa pancreática (PPL). TS: estado de transición; ES: complejo enzima-sustrato; E-acil: intermediario acil-enzima (Stergiou y col., 2013)

Se ha comprobado que cuando la lipasa de *R. miehei* se encuentra en un disolvente orgánico no presenta activación interfacial, incluso en presencia de polietilen glicol (PEG) que ayuda a su completa solubilización. Sin embargo, la lipasa de *Mucor circinelloides* presenta activación en presencia de algunos disolventes orgánicos como dietanolamina, trietanolamina, piridina, piperazina, dimetil formamida y cetilpiridinio bromuro. Esta activación se debe a que se forma un enlace entre el grupo indol del residuo de triptófano localizado en la superficie de la cubierta del centro activo y la molécula activadora, lo que cambia la conformación de la cubierta a una posición catalítica favorable. Este fenómeno parece ser muy similar a la activación interfacial en un sistema acuoso (Kapoor & Gupta, 2012).

Con respecto al mecanismo de acción de esterificación, se ha visto que un ácido graso forma un complejo intermediario acil-enzima con la lipasa, liberando una molécula de agua, seguido por la unión del alcohol a este complejo. El complejo acil-enzima es entonces transformado a un complejo lipasa-éster, que acaba liberando la enzima y el éster. La esterificación se realiza en medios no acuosos o con baja cantidad de agua, utilizando disolventes orgánicos. Las reacciones catalizadas por lipasas en medios orgánicos tienen ciertas ventajas biotecnológicas, como son: aumento de la estabilidad termodinámica de la lipasa; desviación del equilibrio termodinámico a la producción de ésteres y la eliminación de contaminación microbiológica.

Debido al carácter hidrofóbico de la zona de contacto lipídico cercana al centro activo, no se descarta la posible interacción con otros compuestos de carácter similar e incluso con zonas hidrofóbicas de otras enzimas. Estas interacciones producirían agregados con baja o ninguna actividad debido al bloqueo de los centros activos por estas enzimas (González-Bacero y col., 2010; Stergiou y col., 2013).

3.1.2.3. Condiciones óptimas de actuación de las lipasas

Muy pocas lipasas son específicas en sus reacciones, por lo que el término especificidad se ha ido sustituyendo en la literatura por el de selectividad. Las lipasas pueden ser selectivas para la posición, el sustrato (tanto por la clase de ácido graso como por el alcohol del mismo), el esteroisómero e incluso poseer combinaciones de las selectividades mencionadas (González-Bacero y col., 2010; Kapoor & Gupta, 2012).

En general, el pH óptimo de las lipasas depende del sustrato y del tampón utilizado, y se sitúa normalmente en un pH neutro o alcalino. Sin embargo, existen lipasas con pH óptimos que se encuentra en el rango ácido. El pH óptimo de las lipasas puede variar al ser inmovilizadas, con respecto a su forma soluble (Stergiou y col., 2013; Verma y col., 2012).

La temperatura óptima depende entre otros factores del sustrato utilizado, ya que éste presenta un papel protector frente a la desnaturalización térmica. El intervalo normal de la temperatura óptima de las lipasas suele estar entre 35 y 50 °C. El medio de cultivo es otro factor importante para determinar la temperatura de reacción (González-Bacero y col., 2010).

Las lipasas pueden ser inhibidas por organofosfatos, carbodiimidas en presencia de nucleófilos, el yodo, los ácidos borónicos, el fenil-metil-sulfonil-fluoruro, los metales pesados, el EDTA, los iones halógenos, los alcaloides, el cloroformo, el *n*-hexanol, el dietil-fenil carbonato, el bromoformo, algunos cationes metálicos y algunos detergentes. Las proteínas inhibidoras son más específicas, pudiendo inhibir a muy pocas lipasas o una única lipasa. Hay proteínas hidrofóbicas como la albúmina de suero bovino, que inhiben a las lipasas mediante unión competitiva a la interfase. También existen fenómenos de inhibición por exceso de sustrato e inhibición por producto producida por los ácidos grasos. Los iones metálicos pueden estabilizar o desestabilizar la estructura de las lipasas, pudiendo actuar como inhibidores o activadores de las mismas. Hay muchas lipasas que requieren el ión Ca^{2+} para adquirir una conformación estable y catalíticamente competente. Además, algunos iones provocan efectos opuestos en lipasas diferentes. El efecto inhibitorio del EDTA se debe a que secuestra los iones de Ca^{2+} . Al igual que los iones metálicos, los detergentes pueden actuar como activadores o inhibidores dependiendo de la lipasa y del detergente utilizado (González-Bacero y col., 2010).

3.1.2.4. Clasificación de las enzimas lipolíticas bacterianas

Las lipasas microbianas se clasificaron en 8 familias en base a la homología de las secuencias de aminoácidos y a sus funciones fisiológicas (Arpigny & Jaeger, 1999; Jaeger & Eggert, 2002). En los últimos años se han descrito 8 nuevas familias (Bassegoda y col., 2012; Bayer y col., 2010; Cantarel y col., 2009; Fu y col., 2013a; Handrick y col., 2001; Kim y col., 2009; Lee y col., 2010; Lee y col., 2006; Lenfant y col., 2012; Levisson y col., 2007; Montoro y col., 2009; Rao y col., 2011) y se ha subdividido la familia V (Lenfant y col., 2012).

Familia I (Triacilglicerol lipasas)

En esta familia se engloba a todas las lipasas verdaderas y está formada por ocho subfamilias.

Subfamilia I.1 y I.2

Las lipasas pertenecientes a la subfamilia I.1 muestran masas moleculares que oscilan entre 30 y 32 kDa. Estas dos subfamilias comprenden lipasas de bacterias Gram-negativas que son secretadas mediante el sistema de secreción de tipo II (Braun y col., 1996; Koster y col., 2000; Ma y col., 2003; Messaoudi y col., 2010; Pugsley, 1992; Tommassen y col., 1992). Ambas subfamilias incluyen dos residuos de ácido aspártico que median la unión de un ión Ca^{2+} , el cual estabiliza y orienta la histidina catalítica (Nardini y col., 2000).

Subfamilia I.3

Las lipasas de esta subfamilia, presentan una masa molecular de 50-65 kDa y, a diferencia de las subfamilias I.1 y I.2, se exportan utilizando el sistema de secreción de tipo I (Arpigny & Jaeger, 1999; Messaoudi y col., 2010). Estas lipasas poseen una señal de secreción C-terminal, en lugar de una secuencia señal N-terminal (Akatsuka y col., 1994; Amada y col., 2000; Delepelaire, 2004; Holland y col., 2005; Kwon y col., 2002). Estas enzimas poseen un ión Ca^{2+} que se une a la hélice de la tapadera de la lipasa y que resulta esencial para la actividad enzimática (Meier y col., 2007).

Subfamilia I.4

Las lipasas de esta familia son triacilglicerol lipasas pequeñas de una masa molecular de 20 kDa (Arpigny & Jaeger, 1999). A este grupo pertenecen varias lipasas del género *Bacillus* que contienen una secuencia del pentapéptido conservado formado por Ala-X-Ser-X-Gly (Arpigny & Jaeger, 1999; Messaoudi y col., 2010). La posición X_2 del pentapéptido está ocupada por una Met, lo que es exclusivo de esta subfamilia de lipasas (Ruiz y col., 2002). Esta subfamilia carece de un dominio "tapadera" y de un sitio de unión para el ión Ca^{2+} (Van Pouderoyen y col., 2001).

Subfamilia I.5

Esta subfamilia comprende lipasas de diferentes bacterias Gram-positivas pertenecientes a los géneros *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Geobacillus* y *Clostridium*.

El pH óptimo difiere notablemente en esta subfamilia, abarcando desde pH 7,5 a pH 9,5 (Kim y col., 1998; Lee y col., 1999; Rua y col., 1997). La masa se encuentra alrededor de 46 kDa (Nthangeni y col., 2001) debido a las grandes inserciones que poseen las típicas α/β hidrolasas (Tyndall y col., 2002).

Subfamilia I.6

Engloba varias lipasas producidas por diferentes especies del género *Staphylococcus*. Estas lipasas se expresan como pre-proteínas con una masa molecular de aproximadamente 75 kDa, dando lugar a una lipasa madura con una masa molecular de 46 kDa (Gotz y col., 1998; Rosenstein & Gotz, 2000). Estas lipasas presentan estabilidad entre pH 4 y 9 (Sayari y col., 2001).

Subfamilia I.7

Las lipasas de esta subfamilia muestran similitud con la región central de la estructura primaria de las lipasas de la subfamilia I.2. Se han identificado lipasas de este grupo provenientes de *Streptomyces cinnamoneus* (Sommer y col., 1997), *Propionibacterium acnes* (Miskin y col., 1997), *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium adolescentis* (Messaoudi y col., 2010).

Subfamilia I.8

Esta subfamilia de lipasas se propuso tras la identificación de la lipasa Lip1 de la bacteria psicrófila *Pseudoalteromonas haloplanktis* (de Pascale y col., 2008). Lip1 posee una masa molecular de 51 kDa y muestra una actividad creciente hacia ésteres de cadena larga. Estas lipasas parecen carecer de “tapadera” así como del “bolsillo” de unión a calcio, y poseen la secuencia LGG(F/L/Y)STG como un nuevo motivo consenso de centro activo alrededor de la serina catalíticamente activa (de Pascale y col., 2008).

Familia II

Esta familia comprende las enzimas GDSL/SGNH, las cuales contienen, en lugar del pentapéptido conservado del centro activo GX SXG, un tetrapéptido GDS(L) ubicado en la parte N-terminal (Arpigny & Jaeger, 1999). Este tetrapéptido se ubica en el bloque 1 de los cinco bloques de aminoácidos conservados que contiene esta familia.

En cada uno de estos bloques se identifica un aminoácido conservado, siendo estos aminoácidos una serina, una glicina, una asparagina y una histidina, lo que les da el nombre de SGNH hidrolasas y son esenciales para la catálisis (Molgaard, 2003).

Familia III

Las lipasas extracelulares de las especies de *Streptomyces* y *Moraxella* forman parte de esta familia (Cruz y col., 1994; Feller y col., 1990; Perez y col., 1993), presentando una masa molecular de 32-35 kDa y una elevada similitud con isoformas monoméricas del factor de activación de plaquetas acetilhidrolasa de seres humanos (PAF-AH) (Arpigny & Jaeger, 1999; Kleeberg y col., 2005; Uchida y col., 2002). La estructura terciaria de una lipasa de *S. exfoliatus* reveló que no contenía la “tapadera” (Wei y col., 1998).

Familia IV

Esta familia comprende esterases de microorganismos procariotas psicrófilos, mesófilos o termófilos, que muestran similitud con la familia de lipasas sensibles a hormonas de mamíferos (HSL) (Hemilae y col., 1994). Esta familia posee una secuencia consenso H-G-G-G, involucrada en la catálisis (De Simone y col., 2000; Manco y col., 1999; Wei y col., 1999). Las esterases bacterianas de esta familia muestran actividad solo hacia ácidos grasos de cadena corta (Chahinian y col., 2005).

Varias esterases de esta familia (De Simone y col., 2000; De Simone y col., 2001; Wei y col., 1999; Zhu y col., 2003), han mostrando una estructura única, una “cubierta” que difiere notablemente de la “tapadera” de las lipasas verdaderas (Wang y col., 2005).

Familia V

A esta familia pertenecen esterases producidas por diferentes bacterias mesófilas o por microorganismos adaptados a temperaturas extremas, como por ejemplo Est2 y EstV. Estas enzimas poseen el típico dominio α/β hidrolasa y muestran una alta similitud a enzimas bacterianas como las epóxido hidrolasas, las deshalogenasas y las haloperoxidasas (Arpigny & Jaeger, 1999). Todas ellas poseen características típicas de las carboxilesterasas (Cai y col., 2011; Kashima y col., 1998; Kashima y col., 1999; Ruiz y col., 2007).

Familia VI

Las enzimas pertenecientes a esta familia presentan masas moleculares entre 23 y 26 kDa, con alguna excepción (Arpigny & Jaeger, 1999; Kim y col., 2006). Estas enzimas muestran una similitud de aproximadamente el 40% con las lisofosfolipasas de organismos eucariotas. Además de lisofosfolipasas, esta familia también se compone de carboxilesterasas con amplia especificidad de sustrato. Al igual que las familias IV y V, poseen tres bloques con dominios conservados (Arpigny & Jaeger, 1999; Lenfant y col., 2012).

Familia VII

Las esterasas de esta familia presentan una masa molecular de aproximadamente 55 kDa y muestran una similitud significativa con las acetilcolina esterasas y las carboxilesterasas del intestino y del hígado (Arpigny & Jaeger, 1999). Las enzimas de esta familia son producidas por varias cepas de los géneros *Bacillus*, *Peaenibacillus* y *Geobacillus* (Nthangeni y col., 2005). Entre los sustratos típicos de estas carboxilesterasas se encuentran triglicéridos y derivados de *p*-nitrofenil con ácidos grasos de cadena corta.

Familia VIII

Las enzimas de la familia VIII tienen una masa molecular de unos 42 kDa y algunas necesitan la multimerización para la formación de enzimas activas. Estas enzimas no comparten la típica estructura α/β -hidrolasa, mostrando similitud con β -lactamasas y DD-peptidasas (Elend y col., 2006; Nishizawa y col., 1995; Schutte & Fetzner, 2007).

La serina nucleofílica se encuentra localizada en el motivo SXXK (Petersen y col., 2001; Wagner y col., 2002). Algunas de estas esterasas presentan alta tolerancia a los disolventes y un motivo adicional en el extremo C-terminal (Elend y col., 2006; Ogino y col., 2004; Schutte & Fetzner, 2007).

Nuevas familias de enzimas lipolíticas

Además de las familias descritas por Arpigny y Jaeger (1999), se han aislado varias lipasas que se han propuesto como representantes de nuevas familias de enzimas lipolíticas.

Las enzimas pertenecientes a la propuesta como familia IX (PhaZ7) poseen un pentapéptido conservado formado por los residuos AXSXG (Handrick y col., 2001). Las pertenecientes a las nuevas familias X (EstD, LipR) y XII (LipEH166), poseen un pentapéptido conservado formado por los residuos GX SXG (Bassegoda y col., 2012; Kim y col., 2009; Levisson y col., 2007). Las enzimas de las nuevas familias XI (LipG) y XIII (Est30) poseen un motivo conservado formado por los residuos GX SXGG (Ewis y col., 2004; Lee y col., 2006; Liu y col., 2004). La nueva familia XIV (EstA3) posee el pentapéptido CHSMG (Rao y col., 2011). En el caso de la familia XV (EstD2, EstGK1, EstZ3), EstGK1 contiene el pentapéptido conservado GHSQG, mientras que EstZ3 contiene una nueva variación de este pentapéptido SHSQG (Bayer y col., 2010; Lee y col., 2010). La enzima perteneciente a la familia XVI (Est97) tiene un plegamiento α/β -hidrolasa típico, con Ser144-His226-Asp197 como triada catalítica y una “cubierta” muy pequeña que forma una α -hélice y un lazo desordenado (Fu y col., 2013a). Por último, la subfamilia I.9, con la lipasa HZ como primer miembro de la misma, esta enzima posee el pentapéptido conservado GHSMG (Masomian y col., 2016).

3.1.2.5. Lipasas como catalizadores en la producción de Biodiésel

En la literatura se ha descrito un número importante de microorganismos productores de lipasas (Tabla 6) (Stergiou y col., 2013; Treichel y col., 2010). El uso de estas enzimas para la producción de Biodiésel podría ser ventajoso, ya que actúan en la interfase entre una fase orgánica y una fase acuosa, aumentando su actividad al aumentar el área de la interfase. Teniendo en cuenta esta característica de las lipasas, la producción de Biodiésel podría abarataarse ya que se podrían utilizar aceites usados, los cuales contienen mayor cantidad de agua y son más baratos.

Por ejemplo, Zhen-qian and Chun-Yun (2009) han descrito una lipasa de *Enterobacter agglomerans* que podía actuar incluso a concentraciones de agua del 92,4% (Zhen-qian & Chun-yun, 2008).

Tabla 6. Ejemplos de microorganismos productores de lipasas

Microorganismo	Tipo	Referencia
<i>Aspergillus niger</i>	Hongo	Helen Treichel y col. 2010
<i>Colletotrichum gloesporioides</i>	Hongo	Helen Treichel y col. 2010
<i>Geotrichum candidum</i>	Hongo	Helen Treichel y col. 2010
<i>Penicillium verrucosum</i>	Hongo	Helen Treichel y col. 2010
<i>Rhizomucor miehei</i>	Hongo	Russell y col. 1998
<i>Rhizopus arrhizus / R. oryzae</i>	Hongo	Helen Treichel y col. 2010
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Hongo	Russell y col. 1998
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Levadura	Helen Treichel y col. 2010
<i>Candida rugosa</i>	Levadura	Helen Treichel y col. 2010
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Levadura	Helen Treichel y col. 2010
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Levadura	Helen Treichel y col. 2010
<i>Trichosporon asahii</i>	Levadura	Helen Treichel y col. 2010
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Levadura	Helen Treichel y col. 2010
<i>Williopsis californica</i>	Levadura	Helen Treichel y col. 2010
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	Arquea	Levisson y col. 2009
<i>Haloarcula marismortui</i>	Arquea	Müller-Santos y col. 2009
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Bacteria	Pratungdejkul y Dharmsthiti, 2000
<i>Bacillus cereus / B. subtilis</i>	Bacteria	S. Dutta y L. Ray (2009) / Helen Treichel y col. 2010
'Biopetro-4'	Bacteria	Helen Treichel y col. 2010
<i>Burkholderia cepacia</i>	Bacteria	Helen Treichel y col. 2010
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Bacteria	Pandey y col. 1999
<i>Clostridium sp.</i>	Bacteria	Pandey y col. 1999
<i>Colwellia psychrerythraea</i>	Bacteria	Pandey y col. 1999
<i>Corynebacterium sp.</i>	Bacteria	Pandey y col. 1999
<i>Dehalococcoides sp.</i>	Bacteria	Pandey y col. 1999
<i>Enterobacter agglomerans</i>	Bacteria	Zhen-qian y Chun-yun (2009)
<i>Geobacillus sp.</i>	Bacteria	Pandey y col. 1999
<i>Propionibacterium sp.</i>	Bacteria	Pandey y col. 1999
<i>Pseudomonas aeruginosa / P. fluorescens</i>	Bacteria	Helen Treichel y col. 2010 / J. Yang y col (2009)
<i>Psychrobacter immobilis</i>	Bacteria	Joseph y col. 2008
<i>Ralstonia sp. CS274</i>	Bacteria	H-Y Yoo y col. (2011)
<i>Rhodoferax sp.</i>	Bacteria	Pandey y col. 1999

Microorganismo	Tipo	Referencia
<i>Serratia rubidaea</i>	Bacteria	Helen Treichel y col. 2010
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bacteria	Pandey y col. 1999
<i>Streptomyces sp.</i>	Bacteria	Pandey y col. 1999
<i>Thermosyntropha lipolytica</i>	Bacteria	Salameh and Wiegel, 2007
<i>Vibrio sp.</i>	Bacteria	Pandey y col. 1999

*Datos modificados de Treichel y col. (2010)

El uso de lipasas extracelulares para reacciones de transesterificación en la producción de Biodiésel está siendo estudiada en distintas condiciones y en diversos microorganismos, tal y como se resume a continuación.

Con respecto al alcohol utilizado en la reacción, Mittelbach (1990) ya consiguió transesterificación de aceite de girasol con alcoholes primarios, como metanol, etanol y 1-butanol, usando las lipasas de *M. miehei* y *C. antartica*, en presencia y en ausencia del disolvente éter de petróleo. Se comprobó que los mejores resultados se obtenían con 1-butanol y etanol, incluso en reacciones sin el disolvente. Al contrario, con el metanol se obtenían eficiencias muy bajas. Más tarde, se describió que, en presencia de hexano como disolvente, la lipasa de *C. antartica* era eficiente para la transesterificación con alcoholes secundarios (61%-83% de conversión) como 2-propanol y 2-butanol, mientras que *M. miehei* lo era con alcoholes primarios de cadena corta (95%-98% conversión), como metanol, etanol, *n*-propanol y butanol. Sin embargo, en ausencia de disolvente, ambos alcoholes bajaron su conversión, siendo nuevamente el metanol el menos eficiente, lo que se atribuyó a la inhibición de la enzima por el metanol (Nelson y col., 1996). El 2-propanol también ha sido propuesto como aceptor acilo por Modi y col. (2006) en la transesterificación de distintos aceites obteniendo conversiones mayores al 91% y manteniendo la reusabilidad de la enzima durante 12 ciclos, mientras que con metanol la enzima se inactiva tras 7 ciclos.

Para minimizar los problemas de inhibición de la enzima por metanol, también se ha probado el uso de distintos disolventes para la metanólisis, como el 1,4-dioxano (Iso y col., 2001) o el alcohol *tert*-butílico (Li y col., 2006; Royon y col., 2007). Además, se ha propuesto pretratar la enzima inmovilizada; de esta forma, se obtuvieron mejores conversiones tras una preincubación de la enzima en metil-oleato durante 30 minutos (Samukawa y col., 2000).

Otra opción es la utilizada por Chen & Wu (2003), los cuales demostraron la posibilidad de regenerar la actividad de la enzima totalmente desactivada de *C. antarctica* hasta un 75% y un 56%, lavando la misma con alcohol *tert*-butílico ó 2-butanol, respectivamente. También se consiguieron incrementos de hasta 10 veces en la actividad de la enzima sin desactivar al lavarla con estos dos compuestos.

Otra estrategia es el uso de aceptores acilos no alcohólicos, los cuales, está comprobado que aumentan la eficiencia de transesterificación. Un ejemplo de esto es el uso de acetato de metilo (Du y col., 2004), el cual incluso en ratios acetato de metilo:aceite 12:1 no produce inhibición de la enzima, mientras que el metanol ya en ratios 1:1 causa inhibición. Utilizando este aceptor acilo se determinó que la enzima permanecía activa incluso tras 100 ciclos y se consiguieron conversiones de hasta el 92%. Modi y col. (2007) utilizaron la lipasa B de *C. antarctica* para probar el acetato de etilo como aceptor acilo, consiguiendo conversiones por encima del 90% para diversos aceites. La actividad de la enzima usando acetato de etilo no decaía ni tras 12 ciclos, mientras que con etanol la actividad desaparecía tras 6 ciclos. Se observa que el acetato de etilo no produce inactivación enzimática ni en ratios 11:1 (acetato de etilo: aceite).

A pesar de los problemas expuestos, se han desarrollado metanólisis efectivas mediante lipasas extracelulares. La lipasa de *C. antarctica* (comercializada bajo el nombre de Novozym 435) inmovilizada ha logrado conversiones del 95%, incluso tras 50 ciclos de operaciones mediante la adición progresiva de metanol (Shimada y col., 1999) y conversiones del 90% usando aceites usados (Shimada y col., 2002). Tras preincubar Novozym 435 con metil-oleato consiguieron conversiones del 97% (Samukawa y col., 2000). Por tanto, se ha probado que la adición progresiva de metanol ayuda a evitar la inhibición producida por el mismo, ya que éste queda disuelto completamente.

Kaieda y col. (2001) investigaron la metanólisis del aceite de soja tanto de lipasas no-regioespecíficas, como de lipasas regioespecíficas. Entre las lipasas no-regioespecíficas seleccionadas, las de *C. rugosa*, *P. cepacia* y *P. fluorescens* presentaron alta actividad catalítica y la enzima de *P. cepacia* resultó presentar alta tolerancia a la inhibición por metanol.

Existen también ejemplos de lipasas 1,3-regioespecíficas interesantes para la transesterificación, como la lipasa de *Ralstonia sp.* CS274, la cual parece ser estable en metanol, a concentraciones a las que otras lipasas serían inhibidas (Yoo y col., 2011), o la lipasa de *Bacillus sphaericus* 205y, la cual es más estable en metanol que en medios sin el disolvente (Sulong y col., 2006).

En otros estudios como los de Bako y col. (2002), se sugiere que el efecto inhibitorio sobre la enzima se debe, en parte, al glicerol, producto secundario de la reacción de transesterificación, recomendando la eliminación *in situ* de éste mediante diálisis, además de la adición progresiva del metanol. Este procedimiento aumentó la eficiencia de la reacción, produciendo conversiones del 97% (Du y col., 2004).

Los estudios más recientes sobre el uso de lipasas para la producción de Biodiésel se centran en las reacciones catalizadas mediante enzima inmovilizada. Un ejemplo es el uso de la lipasa de *P. cepacia* inmovilizada en sílica hidrofóbica *n*-butílica, para la conversión de aceite de *Jatropha* y metanol (ratio 3:1 de metanol:aceite) a Biodiésel, en un proceso continuo, alcanzando un rendimiento del 90% (Kawakami y col., 2011). Paralelamente se ha utilizado una lipasa de *Burkholderia cenocepacia* inmovilizada en una resina macroporosa NKA, la cual ha mostrado rendimientos catalíticos similares en la producción de Biodiésel (Liu y col., 2011).

Otro ejemplo es el uso de sistemas multi-fases menos viscosos, en los que se puede disolver más cantidad de alcohol. En estos casos, el agua es el mayor subproducto de la reacción de esterificación. Otra opción es el uso de grandes cantidades de alcohol para llevar la reacción a la formación de ésteres (Stergiou y col., 2013).

También se ha estudiado el uso del microorganismo completo, lo que se ha propuesto como un método económicamente eficiente y alternativo al uso de enzimas purificadas. De esta manera se han diseñado varios procedimientos para la producción de Biodiésel, obteniendo rendimientos altos y aportando mayor estabilidad celular. Un ejemplo son las células de *R. oryzae* IFO 4697 tratadas con glutaraldehído e inmovilizadas, las cuales mantenían su actividad durante seis ciclos (Hama y col., 2007). Otros microorganismos, como *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021, se han utilizado de esta misma forma para la producción de Biodiésel (Qin y col., 2008).

Uno de los ejemplos más recientes es el uso de la levadura recombinante *Pichia pastoris* expresando lipasas de organismos como *Thermomyces lanuginosus*, en un proceso de producción de Biodiésel que combina la acción de la enzima extracelular y la célula completa del microorganismo, que incluye la enzima intracelular, obteniéndose rendimientos de hasta el 87% (Yan y col., 2014a; Yan y col., 2014b).

3.1.3. Tecnologías de producción de Biodiésel que integran el glicerol

El aumento en la producción de Biodiésel ha dado lugar a un aumento de la producción del glicerol como subproducto. En Europa el precio del glicerol disminuyó enormemente debido al suministro extensivo en el mercado, lo que ha afectado a las compañías químicas productoras de este producto. En procesos de producción de Biodiésel utilizando catalizadores básicos, el glicerol representa el 10% de la masa de la materia prima y se recupera al final del proceso de transesterificación en una mezcla junto al metanol, agua y residuos del catalizador alcalino. Así, para obtener glicerol puro de esta mezcla es necesario el uso de varios procesos de purificación complejos, lo que encarece 10 veces el precio del glicerol puro, en comparación con el glicerol sin purificar, convirtiéndolo en un proceso no viable económicamente. Por tanto, una línea de investigación importante es aquella en la que se estudian procesos de producción de Biocombustible que evitan la necesidad de separar el glicerol del Biodiésel, abaratando así el proceso (Ilham & Saka, 2010).

Una de las alternativas consideradas ha sido la incorporación de derivados del glicerol en el producto final. De esta forma, un Biocombustible formado por una mezcla de derivados del glicerol y ésteres metílicos (FAME) o etílicos (FAEE) de ácidos grasos, evitaría la separación del glicerol del producto final y aumentaría el rendimiento del proceso, ya que el número total de moles de carbono involucrados en la reacción se mantendría en el producto final (Luna y col., 2013; Verdugo y col., 2010). Algunos ejemplos de estas metodologías que integran el glicerol en el producto final se basan en la interesterificación de los triglicéridos (TG) con dimetil-carbonato (Ilham & Saka, 2009; Ilham & Saka, 2010), acetato de metilo (Ognjanovic y col., 2009; Saka & Isayama, 2009) o acetato de etilo (Modi y col., 2007), lo que resulta en una mezcla de 3 moléculas de FAME o FAEE y una de glicerol carbonato o glicerol triacetato.

3.1.3.1. Método del dimetil carbonato

Se ha descrito el uso de un posible nuevo método para la producción de Biodiésel en un solo paso y sin utilizar ningún catalizador, mediante la utilización de dimetilcarbonato supercrítico (Figura 7) (Ilham & Saka, 2009). En este proceso de interesterificación directa de triglicéridos se produciría FAMEs, y como subproductos del proceso, el carbonato de glicerol y ácido citramálico. La esterificación de los ácidos grasos libres produce FAMEs y glicoxal, permitiendo así que puedan utilizarse materias primas con alto contenido en ácidos grasos, que en el proceso convencional reaccionarían con el catalizador alcalino, produciendo sustancias saponificables y reduciendo así el rendimiento del proceso. En el experimento que describe Ilham & Saka (2009), tras 12 minutos de reacción a 350°C y 20 MPa, el aceite de colza tratado con dimetil carbonato supercrítico alcanzó un rendimiento del 94% de FAMEs. Al finalizar el proceso, la mezcla de reacción se separó en una fase superior e inferior tras la evaporación de dimetil carbonato. La fase superior estaba formada por triglicéridos, diglicéridos metil carbonato (DGMC), monoglicérido dimetil carbonato (MGDMC) y FAME. La fase inferior, al contrario, estaba compuesta por el glicerol carbonato y el ácido citramálico. Así el proceso se ha descrito en tres pasos (Figura 7):

- 1- El triglicérido reacciona con el dimetil carbonato dando lugar al DGMC.
- 2- El DGMC reacciona con el dimetil carbonato formando MGDMC.
- 3- Finalmente el MGDMC reacciona con el dimetil carbonato para formar FAME, glicerol carbonato y ácido citramálico.

Así se produce una molécula de FAME en cada uno de los tres pasos descritos. Los subproductos formados en este proceso, el glicerol carbonato y el ácido citramálico son de mayor valor que el glicerol producido en el proceso convencional, aunque el mayor problema para su aplicación industrial son las severas condiciones de reacción utilizadas (Ilham & Saka, 2009; Ilham & Saka, 2010).

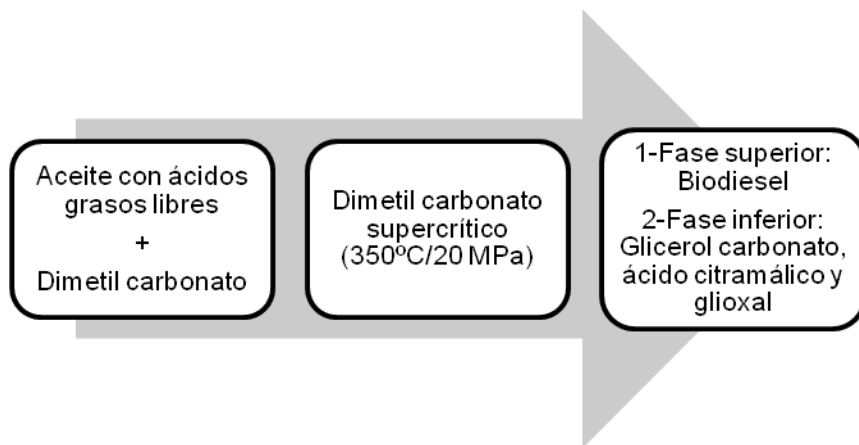


Figura 7. Esquema de producción de Biodiésel mediante el método de dimetil carbonato supercrítico

3.1.3.2. Método del acetato de metilo y acetato de etilo

En un intento por mejorar la estabilidad de la enzima de *C. antarctica* (Novozyme 435) en la producción de Biodiésel a partir de aceites vegetales se ha sustituido el metanol por dos aceptores acilo, el acetato de metilo y el acetato de etilo (Modi y col., 2007; Ognjanovic y col., 2009), cuya reacción produce triacetina en lugar de glicerol. El uso de acetato de metilo o de etilo resultó de gran interés, obteniendo rendimientos mayores del 90% y un mayor tiempo de vida media y reusabilidad de la enzima inmovilizada, comparada con la producción utilizando el metanol o etanol. La reacción con acetato de metilo se ha verificado también industrialmente, donde se obtuvieron rendimientos del 93,6% tras 8-10 h, sin decaer su productividad durante 72 h (Modi y col., 2007; Ognjanovic y col., 2009).

Se ha descrito también la utilización de acetato de metilo supercrítico para la producción de Biodiésel a partir de aceite de colza, sin catalizador (Saka & Isayama, 2009). En este proceso de interesterificación de los triglicéridos se produce FAME y triacetina (Figura 8). El proceso ocurre, al igual que para la producción de Biodiésel mediante dimetil carbonato supercrítico, en tres pasos:

- 1- Reacción del triglicérido con el acetato de metilo para crear una molécula de monoacetildiglicérido y una de FAME.
- 2- Formación de una molécula de diacetildiglicérido y otra de FAME al reaccionar una molécula de monoacetildiglicérido y una de acetato de metilo.

3- Generación de triacetina y FAME al reaccionar el diacetilglicérido y el acetato de metilo.

El Biofuel así producido es una mezcla de FAME y triacetina en un ratio molar 3:1 y no se vio afectado en sus características como fuel por la adición de la triacetina, al contrario, su punto de fluencia mejoró, y su estabilidad frente a la oxidación también.

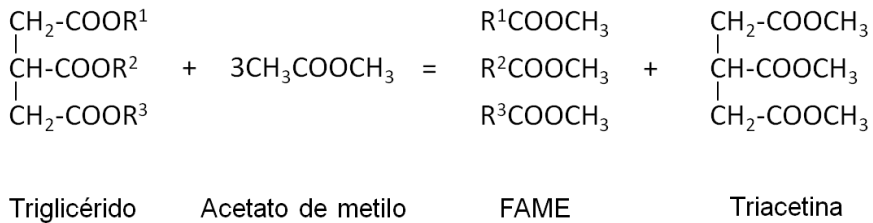


Figura 8. Esquema de interesterificación de triglicéridos mediante acetato de metilo

La reacción de interesterificación de triglicéridos usando acetato de etilo es similar a la reacción de interesterificación con acetato de metilo, sólo que en vez de FAMEs y triacetina, se produce FAEEs y triacetina. Esto elimina el riesgo de desactivación de la enzima por glicerol, ya que no se produce este subproducto en la reacción. Además, la triacetina como subproducto de la interesterificación, no tiene efecto negativo en la actividad de la enzima.

3.1.3.3. Producción de Biodiésel con lipasas 1,3-regioespecíficas

Se ha patentado un nuevo método para obtener Biodiésel mediante etanolisis (transesterificación) parcial de triglicéridos usando la lipasa pancreática porcina (PPL), una pequeña cantidad de solución acuosa de NaOH y etanol. Esta lipasa, al igual que otras muchas que ya se han mencionado en puntos anteriores, es 1,3-regioespecífica, por lo que sólo produce una transesterificación parcial de los triglicéridos, quedando el glicerol en forma de monoglicérido con un único ácido graso unido en el carbono 2 (Figura 9), lo que da lugar a una mezcla de FAEEs y monoglicéridos (MG) (Luna y col., 2013; Verdugo y col., 2010). Este tipo de Biodiésel presenta unas características físicas similares al Biodiésel convencional y al mismo tiempo mantiene al glicerol en su propia composición, lo que evita su producción como subproducto y posterior separación del Biodiésel, abaratando así el proceso de producción. También se ha demostrado que tanto los monoglicéridos como los diglicéridos aumentan la lubricidad del Biodiésel.

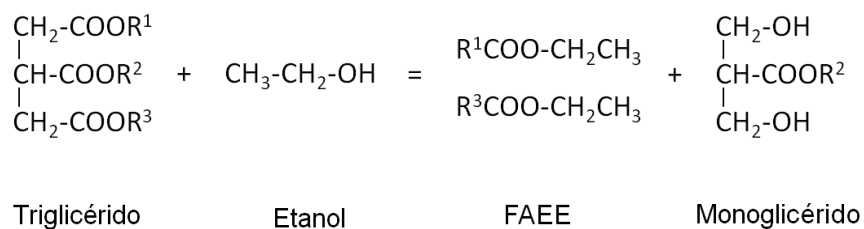


Figura 9. Esquema de reacción de transesterificación con etanol y una lipasa 1,3-regioespecífica. A pesar de las ventajas de este nuevo Biodiésel, el principal inconveniente es el alto coste de la enzima purificada, y que no es fácil obtener rendimientos mayores del 60% a cortos tiempos de reacción, aunque existan trabajos donde se han conseguido rendimientos del 75 y 90% a tiempos relativamente largos (más de 24 h) (Camacho y col., 2006; Paula y col., 2007). Por lo tanto, es necesario optimizar este procedimiento enzimático antes de ser utilizado a escala industrial (Luna y col., 2013; Verdugo y col., 2010).



3. CAPÍTULO 1

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS



3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Material biológico

3.2.1.1. Cepas bacterianas

En la Tabla 7 se muestran las cepas comerciales bacterianas utilizadas en este trabajo.

Tabla 7. Cepas bacterianas utilizadas

CEPA BACTERIANA	CARACTERÍSTICAS RELEVANTES	FUENTE O REFERENCIA
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F ⁻ , <i>lacZ</i> Δ M15, <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> Δ (<i>lacZYA argF</i>) Nal ^R	(Hanahan, 1983)
<i>E. coli</i> BIVU111	Derivada de <i>E. coli</i> BL21, sin el profago DE3, módulo <i>nahR PsaI::ARN pol T7</i>	(de Lorenzo y col., 1993b)

3.2.1.2. Plásmidos

Plásmidos utilizados

Los plásmidos utilizados en este trabajo se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Plásmidos utilizados

Plásmido	Características relevantes	Fuente o referencia
pBC SK(+)	Derivado de pUC19, promotor P <i>lac</i> , promotor T7, Cm ^R	(Short y col., 1988)
pGEM-T	Promotores T7 y SP6, Amp ^R Permite la clonación de productos de PCR con un extremo A libre	Promega
pET-15Kb	Derivado de pET28c con un fragmento de 57 pbs que contiene el ORF de la enzima cloranfenicol acetil transferasa (CAT)	Suministrado por el kit <i>ExiProgen</i> TM EC1 Protein Synthesis Kit. Bioneer)

pBC: pBlueScript; Cm^R: resistencia a Cloranfenicol; Amp^R: resistencia a ampicilina; P*lac*: promotor del operón *lac*

Plásmidos construidos

Los plásmidos construidos durante el desarrollo de este trabajo se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Plásmidos construidos

Plásmido	Cepa hospedadora	Características relevantes
pGEM-T-Lip1	<i>E.coli</i> DH5 α	Derivado de pGEM-T Amp ^R con un fragmento de 0,888 kb que contiene el ORF de la lipasa/esterasa candidata 1 obtenido por PCR a partir del ADN genómico de <i>Terribacillus</i> sp. AE2B 122, utilizando los oligonucleótidos Lip1F y Lip1R
pGEM-T-Lip2	<i>E.coli</i> DH5 α	Derivado de pGEM-T Amp ^R con un fragmento de 0,6 kb que contiene el ORF de la lipasa/esterasa candidata 2 obtenido por PCR a partir del ADN genómico de <i>Terribacillus</i> sp. AE2B 122, utilizando los oligonucleótidos Lip2F y Lip2R.
pGEM-T-Lip3	<i>E.coli</i> DH5 α	Derivado de pGEM-T Amp ^R con un fragmento de 0,924 kb que contiene el ORF de la lipasa/esterasa candidata 3 obtenido por PCR a partir del ADN genómico de <i>Terribacillus</i> sp. AE2B 122, utilizando los oligonucleótidos Lip3F y Lip3R
pGEM-T-Lip4	<i>E.coli</i> DH5 α	Derivado de pGEM-T Amp ^R con un fragmento de 0,966 kb que contiene el ORF de la lipasa/esterasa candidata 4 obtenido por PCR a partir del ADN genómico de <i>Terribacillus</i> sp. AE2B 122, utilizando los oligonucleótidos Lip4F y Lip4R
pGEM-T-Lip5	<i>E.coli</i> DH5 α	Derivado de pGEM-T Amp ^R con un fragmento de 0,906 kb que contiene el ORF de la lipasa/esterasa candidata 5 obtenido por PCR a partir del ADN genómico de <i>Terribacillus</i> sp. AE2B 122, utilizando los oligonucleótidos Lip5F y Lip5R
pGEM-T-Lip6	<i>E.coli</i> DH5 α	Derivado de pGEM-T Amp ^R con un fragmento de 0,729 kb que contiene el ORF de la lipasa/esterasa candidata 6 obtenido por PCR a partir del ADN genómico de <i>Terribacillus</i> sp. AE2B 122, utilizando los oligonucleótidos Lip6F y Lip6R
pGEM-T-Lip7	<i>E.coli</i> DH5 α	Derivado de pGEM-T Amp ^R con un fragmento de 0,606 kb que contiene el ORF de la lipasa/esterasa candidata 7 obtenido por PCR a partir del ADN genómico de <i>Terribacillus</i> sp. AE2B 122, utilizando los oligonucleótidos Lip7F y Lip7R
pGEM-T-Lip8	<i>E.coli</i> DH5 α	Derivado de pGEM-T Amp ^R con un fragmento de 0,978 kb que contiene el ORF de la lipasa/esterasa candidata 8 obtenido por PCR a partir del ADN genómico de <i>Terribacillus</i> sp. AE2B 122, utilizando los oligonucleótidos Lip8F y Lip8R
pBC SK(+)-Lip1	<i>E.coli</i> BIVU111	Derivado de pBC KS (+)-Cm ^R linearizado con <i>EcoRV</i> , con un fragmento de 0,920 kb que contiene el ORF de la lipasa/esterasa candidata 1 obtenido por PCR a partir del plásmido pGEMT-Lip1, utilizando los oligonucleótidos MAO346 y MAO347
pBC SK(+)-Lip2	<i>E.coli</i> BIVU111	Derivado de pBC KS (+)-Cm ^R linearizado con <i>EcoRV</i> , con un fragmento de 0,632 kb que contiene el ORF de la lipasa/esterasa candidata 2 obtenido por PCR a partir del plásmido pGEMT-Lip2, utilizando los oligonucleótidos MAO348 y MAO349
pBC SK(+)-Lip3	<i>E.coli</i> BIVU111	Derivado de pBC KS (+)-Cm ^R linearizado con <i>EcoRV</i> , con un fragmento de 0,956 kb que contiene el ORF de la lipasa/esterasa candidata 3 obtenido por PCR a partir del plásmido pGEMT-Lip3, utilizando los oligonucleótidos MAO350 y MAO351

Plásmido	Cepa hospedadora	Características relevantes
pBC SK(+)-Lip4	<i>E.coli</i> BIVU111	Derivado de pBC KS (+)-CmR linearizado con EcoRV, con un fragmento de 0,998 kb que contiene el ORF de la lipasa/esterasa candidata 4 obtenido por PCR a partir del plásmido pGEMT-Lip4, utilizando los oligonucleótidos MAO352 y MAO353
pBC SK(+)-Lip5	<i>E.coli</i> BIVU111	Derivado de pBC KS (+)-CmR linearizado con EcoRV, con un fragmento de 0,938 kb que contiene el ORF de la lipasa/esterasa candidata 5 obtenido por PCR a partir del plásmido pGEMT-Lip5, utilizando los oligonucleótidos MAO354 y MAO355
pBC SK(+)-Lip6	<i>E.coli</i> BIVU111	Derivado de pBC KS (+)-CmR linearizado con EcoRV, con un fragmento de 0,761 kb que contiene el ORF de la lipasa/esterasa candidata 6 obtenido por PCR a partir del plásmido pGEMT-Lip6, utilizando los oligonucleótidos MAO356 y MAO357
pBC SK(+)-Lip7	<i>E.coli</i> BIVU111	Derivado de pBC KS (+)-CmR linearizado con EcoRV, con un fragmento de 0,638 kb que contiene el ORF de la lipasa/esterasa candidata 7 obtenido por PCR a partir del plásmido pGEMT-Lip7, utilizando los oligonucleótidos MAO358 y MAO359
pBC SK(+)-Lip8	<i>E.coli</i> BIVU111	Derivado de pBC KS (+)-CmR linearizado con EcoRV, con un fragmento de 1,01 kb que contiene el ORF de la lipasa/esterasa candidata 8 obtenido por PCR a partir del plásmido pGEMT-Lip8, utilizando los oligonucleótidos MAO360 y MAO361

3.2.1.3. Conservación de las cepas

La conservación de las cepas utilizadas en este trabajo se realizó utilizando dos procedimientos, mantenimiento a 4°C y congelación a -20 y -80°C.

3.2.2. Medios y condiciones de cultivo

El pH de los medios se ajustó con NaOH 1 M (para un pH final de 7 - 7,5) o con HCl al 37% (para un pH final de 5,5 - 6) y se esterilizaron en autoclave a una temperatura de 121°C durante 20 minutos. Para la preparación de los medios de cultivo sólidos se utilizó Bacto-Agar (Difco) a una concentración del 2 %.

3.2.2.1. Medios de cultivo para la selección de organismos lipolíticos

Los organismos lipolíticos se seleccionaron en una serie de medios sólidos con 0,5% de tributirina. La tributirina, al tratarse de un triacilglicerol, es insoluble en agua y para la elaboración del medio fue necesario su sonicación mediante un sonicador Branson Sonifier 250, durante al menos 20 minutos, con el fin de conseguir una adecuada homogenización.

La lectura de las placas es directa, así, si la bacteria posee actividad lipolítica, aparece un halo transparente alrededor de la colonia, tras la incubación a 30°C, durante 4-5 días, lo que significa que se ha hidrolizado el sustrato. Los medios usados fueron Luria Bertani (LB) (Difco), Potato Dextrose Broth (PDB) (Difco), 9K A y 9K Gamp. La solución 9K se preparó tal y como se describe en Silverman & Lundgren (1959) pero sin el FeSO₄ 7H₂O. La composición de los medios se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10. Composición de los medios utilizados en el aislamiento de organismos lipolíticos y transformantes de *E. coli*

Medio	Compuesto	Cantidad de compuesto	pH final
9K A	Glucosa	10 g/L	5,5
	Extracto de levadura	10 g/L	
	Solución K9		
9K Gamp	Glucosa	10 g/L	6
	Extracto de levadura	5 g/L	
	Extracto de malta	10 g/L	
	Ampicilina Solución 9K	20 µg/ml	
Solución 9K	(NH ₄) ₂ SO ₄	3 g/L	5,5
	KCl	0,1 g/L	
	K ₂ HPO ₄	0,5 g/L	
	Ca(NO ₃) ₂	0,01 g/L	
	MgSO ₄ * 7H ₂ O	0,5 g/L	
PYA	Peptona	1% (p/v)	7,5
	Extracto de levadura	0,5% (p/v)	
	K ₂ HPO ₄	0,1% (p/v)	
	MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,02% (p/v)	
TB-Glucosa	Triptona	1,2%	7,5
	Extracto de levadura	2,4%	
	Glucosa	0,05%	
	Glicerol	0,4%	
	K ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄	72 mM 17 mM	

(p/v): peso/volumen

Para la selección de organismos transesterificadores, las bacterias aisladas se crecieron en medio LB líquido adicionado con 2% de tributirina durante 72 h a 30°C y 200 rpm.

Para la optimización de la actividad transesterificadora de *Terribacillus* sp. AE2B 122 se volvió a utilizar LB y LB adicionado con 2% de tributirina más dos medios nuevos, PYA + 1,5% de NaCl y PYA + 1,5% de NaCl + 2% de tributirina. El medio PYA + 1,5% de NaCl se seleccionó por ser un medio utilizado en la bibliografía para el crecimiento de *Terribacillus goriensis* (Kim y col., 2007), ya que en LB se producía lisis de este organismo.

Por este mismo motivo, esta cepa se mantuvo y creció en PYA + 1,5% de NaCl mientras que las demás se mantuvieron y crecieron en LB. Las condiciones de crecimiento de los cultivos fueron 30°C y 200 rpm.

3.2.2.2. Análisis de las actividades hidrolíticas (amilasa, proteasa, DNAsa, pululanasa y xilanasa)

La actividad amilasa se estudió en placas de medio LB sólido suplementado con 0,2 % (p/v) de almidón soluble, 0,5% (p/v) de peptona y 0,3% (p/v) de extracto de carne. Tras 7 días de incubación a 30 °C las placas se cubrieron con una solución de 0,3% (p/v) de I₂ y 0,6% (v/v) de KI. La hidrólisis del almidón produce una zona clara (halo de degradación) alrededor de las colonias (Cowan & Steel, 1985).

La presencia de actividad proteasa se determinó en medio LB sólido suplementado con 2% (p/v) de leche desnatada. La aparición de zonas de precipitación de la paracaseína alrededor de las colonias después de 3 días de incubación a 30°C indicaba la presencia de actividad proteolítica (Cowan & Steel, 1985).

La actividad ADNasa se analizó creciendo las bacterias en placas de medio sólido de ADN agar a 4,2% (p/v). Las placas se incubaron durante 7 días a 30°C y se cubrieron con solución de HCl 1N. La aparición de una zona clara indicaba actividad ADNasa (Jeffries y col., 1957).

Las actividades pululanasa y xilanasa se detectaron por la aparición de zonas de halos azules que se producen debido a la hidrólisis y solubilización del AZCL-pululano o del AZCL-xilano, en placas de LB sólido con 0,1% de AZCL-pululano o AZCL-xilano. Estos compuestos quedan como gránulos insolubles en las placas de LB sólido (Morgan y col., 1979).

3.2.2.3. Medios para el crecimiento de las cepas de *E. coli*

Para el crecimiento y mantenimiento de los clones de *E.coli* DH5α con los genes de las lipasas/esterasas candidatas en pGEM-T se utilizó LB adicionado con Amp. Los clones de *E.coli* BIVU111 con las lipasas candidatas en pBC SK(+) se crecieron el LB adicionado con Cm o TB (Terrific Broth) con Cm.

3.2.3. Compuestos antimicrobianos

Cuando fue necesario, se incluyeron en los medios de cultivo correspondientes los compuestos antimicrobianos (Roche) presentes en la Tabla 11, en la que se muestran los disolventes y la concentración a la que habitualmente se utilizan en *E. coli*. En el caso de la ampicilina que debía ser disuelta en agua se utilizó la esterilización por filtración. Todas las soluciones se conservaron a -20 °C.

Tabla 11. Soluciones de compuestos antimicrobianos

Antimicrobiano	Disolvente	Concentración final para <i>E. coli</i> (µg/ml)
Ampicilina (Amp)	Agua destilada estéril y NaOH 5 N	100
Cloranfenicol (Cm)	Etanol 96%	30

3.2.4. Procesamiento de las muestras de suelo

Las muestras se recogieron en tubos falcon de plástico de 50 ml y se almacenaron a 4°C en oscuridad, hasta ser procesadas durante los 2 meses siguientes. Una parte de las muestras se envió al servicio de Investigación Agraria (CITIUS) para determinar el pH, la conductividad electrónica (C.E.), la humedad, el contenido en cationes, en elementos esenciales (C, N, S, P), materia orgánica y carbonatos totales. El pH, la C.E. y la humedad del suelo se midieron tal y como estaba previamente descrito (Porta Casanellas y col., 1986). La extracción del Ca, Mg, Na, K, Fe, Cu, Mn y Zn biodisponible se realizó tal y como se indica en técnicas descritas anteriormente (Lindsay & Norvell, 1978; Sumner & Miller, 1996). La determinación de los metales pesados mencionados se realizó usando espectrometría de absorción atómica en un espectrofotómetro UNICAM de Thermo. La determinación del C, N y S total se midió en un autoanalizador elemental LECO's CNS-2000. La extracción y la determinación del P biodisponible se realizó tal y como estaba anteriormente publicado (Murphy & Riley, 1962; Olsen y col., 1954). La determinación de la materia orgánica se llevó a cabo mediante calcinación (estándar UNE-EN 13039) y para la determinación de los carbonatos totales se utilizó el protocolo de calcimetría de Bernard (Porta Casanellas y col., 1986).

3.2.5 Extracción, manipulación y purificación de ADN

3.2.5.1. Extracción y purificación de ADN

Extracción de ADN plasmídico

Para la extracción de ADN plasmídico se siguió el método de lisis alcalina:

1. Se centrifugó (1,5 minutos a 7500 rpm), 1 ml de cultivo líquido de *E. coli* crecido durante 24 h en LB y su correspondiente antibiótico
2. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en el medio que quedó
3. Se añadieron 150 µl de Solución I y se resuspendió mediante vortex 5 segundos
4. Se añadieron 200 µl de solución II y se mezcló por inversión 2-3 veces
5. Se dejó 2 min a T^a ambiente
6. Se añadieron 150 µl de solución III y 10 µl de ClCH_3
7. Se mezcló por inversión 2-3 veces y se centrifugó 10 minutos a máxima velocidad
8. Se recogió sobrenadante y se añadieron 350 µl de 2-propanol
9. Se mezcló por inversión y se centrifugó 5 minutos a máxima velocidad
10. Se recogió el precipitado y se lavó con 500 µl de etanol 70%, mezclando con cuidado para no arrastrar el precipitado
11. Se aspiró el sobrenadante con vacío
12. Se resuspendió el precipitado en 50 µl de TE

- **Solución I: Glucosa 50 mM –Tris 25 mM pH 8 - EDTA 10 mM**
- **Solución II: 0,2 mM NaOH - 1% (p/v) SDS**
- **Solución III: Acetato de potasio (AcOK) 3 M pH 5**

Extracción de ADN genómico

El ADN de las bacterias se extrajo siguiendo un protocolo estándar (Green & Sambrook, 2012), que se resume a continuación:

1. Se diluyó un preinóculo de la cepa bacteriana crecida toda la noche en medio LB + antibiótico y se creció hasta fase exponencial
2. Se centrifugaron 5 ml del cultivo 7 minutos a 4000 rpm en tubo de 10 ml

3. Se eliminó el sobrenadante, se resuspendió en 400 µl de tampón de lisis y se pasó a un eppendorf de 2 ml con cierre de seguridad
4. Se añadieron 4 µl de ARNasa 10mg/ml y se incubó 30 minutos a 37°C
5. Se añadieron 20 µl de proteinasa K y se incubó 2 horas a 65°C
6. Se añadió 1 volumen (≈500 µl) de fenol:[cloroformo:alcohol isoamílico (24:1)], 2:[1], se mezcló por inversión, se centrifugó 10 minutos a 13000 rpm, se recogió la fase superior, donde se encuentra el ADN, y se pasó a un eppendorf nuevo. Este paso se repitió hasta que desapareció la fase intermedia de suciedad
7. Se añadió 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1, se mezcló por inversión, se centrifugó 10 minutos a 13000 rpm, se recogió la fase superior y se pasó a un eppendorf nuevo. Con este paso se eliminaron los restos de fenol
8. Se añadió 1/10 volumen de acetato sódico 3M y 2,5 volúmenes de etanol de 96% y se dejó precipitar a -20°C, preferiblemente toda la noche
9. Se centrifugó 30 minutos a 13000 rpm y 4°C
10. Se eliminó el sobrenadante, se añadió 0,5-1 ml de etanol 70% y se centrifugó 2 minutos a 13000 rpm. Se repitió este paso de lavado dos veces
11. Se resuspendió en 30 µl de H₂O MilliQ o TE

- **Tampón de Lisis: Tris-HCl 50 mM pH 8 + EDTA 10 mM + NaCl 100 mM + SDS 0,2 %**
- **Solución ARNasa: 10 mg/ml en 10 mM de tampón acetato sódico, se calienta 15 minutos a 100°C y se ajusta el pH a 7,4 con 0,1 volúmenes de Tris-HCl 1 M a pH 7,4 (concentración final de 10 mM TRIS-HCl)**
- **Solución de Proteinasa K a 20 mg/ml disuelta en H₂O Milli Q**

Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Los fragmentos de ADN de distinto tamaño se separaron mediante electroforesis horizontal utilizando geles de agarosa a una concentración de 0,8-1 % (p/v) y tampón TAE 1X. La visualización del ADN se realizó mediante tinción con bromuro de etidio, tal y como se describe en el manual de Sambrook y Russell (2001). Para un gel de 40 ml se adicionaron 2 µl de una solución de bromuro de etidio (10 mg/ml).

Los pesos moleculares de los fragmentos de ADN se calcularon mediante comparación con marcadores de pesos moleculares comerciales.

- **Tampón TAE 50x: Ácido acético glacial, 57,1 ml; EDTA 50 mM pH 8, 100 ml; Tris base, 242 g; agua destilada, csp 1000 ml.**
- **Tampón de carga: Azul de bromofenol 0,25 % (p/v); sacarosa 40 % p/v; xilén-cianol 0,25 % (p/v). Este tampón se conserva a 4 °C.**

Purificación de ADN a partir de geles de agarosa

Tras la separación de los fragmentos de ADN de distinto tamaño mediante electroforesis en geles de agarosa, se recortaron las bandas conteniendo el ADN de interés, con ayuda de una cuchilla y bajo iluminación UV de baja energía. La banda de agarosa recortada se purificó mediante el kit FavorPrep (Favorgen Biotech Corp) o el kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

3.2.5.2. Manipulación del ADN

Restricción de ADN plasmídico con endonucleasas

Las digestiones de ADN plasmídico se realizaron durante 2 horas a la temperatura recomendada por el fabricante para cada enzima. Las digestiones se llevaron a cabo en un volumen final de 20 μ l. Una digestión típica contiene: 0,5 μ l de enzima, 2 μ l de tampón 10X y 1-20 μ g de ADN plasmídico. Las enzimas de restricción utilizadas en este trabajo fueron de la casa comercial Takara eligiendo para cada enzima el tampón óptimo, según las indicaciones del fabricante.

Ligación de fragmentos de ADN

La ligación de los fragmentos de ADN se realizó con la enzima T4 ADN ligasa (Promega). La relación de vector/inserto varió dependiendo de la naturaleza de los fragmentos a unir:

- Ligaciones de fragmento de ADN y vector con extremos cohesivos: se mantuvo una relación vector:inserto de 1:3.
- Ligaciones de extremos romos: se utilizó la relación vector:inserto de 1:5.

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 10 μ l en tubos estériles de 0,2 ml conteniendo las cantidades apropiadas de vector e inserto, así como el tampón de la ligasa a una concentración final 1X y la enzima T4 ADN ligasa, 1 μ l (5 U), completando con agua destilada estéril según el volumen final de reacción.

La mezcla de reacción se incubó a distintas temperaturas y tiempos dependiendo de si los fragmentos a ligar eran romos (16 °C durante 4-18 horas) o cohesivos (temperatura ambiente durante 12 horas o 4 °C durante toda la noche). En el caso de ligaciones de extremos romos, añadimos doble cantidad de T4 ADN ligasa.

Para las ligaciones en pGEM-T se utilizó el kit de Promega siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las ligaciones se dejaron a 4°C durante toda la noche.

Eliminación de las endonucleasas de restricción

Para eliminar los restos de enzimas y de tampones después de su actuación, se siguió el método de extracción con las soluciones fenol:cloroformo (1:1) y cloroformo, como describen Sambrook y Russell (Sambrook & Russell, 2001). En aquellos casos en los que fue necesaria una mayor purificación se utilizó el kit FavorPrep (Favorgen Biotech Corp) o el kit GFX PCR DNA and GEL PURIFICATION (GE Healthcare), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Transformación de células competentes por choque térmico

Las células competentes utilizadas se prepararon utilizando el siguiente protocolo:

1. Se incubó a 37°C una colonia de *E. coli* en 25 ml de medio LB toda la noche en un matraz de 250 ml
2. Se diluyeron las células 40 veces en medio LB nuevo en 4 matraces de 1L (2,5 ml de cultivo en cada matraz con 100 ml de medio LB)
3. Se incubó a 37°C hasta que la DO_{600nm} alcanzó 0,4-0,5
4. Se enfrió el cultivo en hielo durante 30 minutos
5. Se centrifugó en tubos de 50 ml a 4000 rpm y 4°C durante 5 minutos.

6. Se eliminó el sobrenadante y se colocaron las células en hielo.
7. Se resuspendieron las células de cada tubo de 50 ml en 25 ml de solución A
8. Se incubaron en hielo 30-60 minutos, con agitación manual ocasional
9. Se centrifugaron las células durante 10 minutos a 4°C y 4000 rpm
10. Se eliminó el sobrenadante y se mantuvieron las células en hielo
11. Se resuspendieron las células con un volumen total de 6,7 ml de solución B para los 8 tubos de 50 ml (6,7 ml solución B/400 ml de cultivo original)
12. Se separaron 0,5 ml de suspensión de células en tubos estériles de 2 ml
13. Se congelaron los tubos con nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80°C

- **Solución A: 0,1 M CaCl₂**
 - **Solución B: 0,1 M CaCl₂-15% glicerol**
- Todas las soluciones se preparan en H₂O MilliQ**

El método rutinario de transformación que se ha utilizado durante el desarrollo de esta Tesis doctoral, ha sido el choque térmico descrito por Hanahan (1983) en células competentes de *E. coli*, en concreto las cepas DH5α y que se resume a continuación:

1. Las células competentes se descongelaron en hielo
2. Se pusieron en contacto 10 µl de ligación con las células competentes
3. La mezcla de transformación se mantuvo durante 30 minutos en hielo
4. Posteriormente la muestra se colocó durante 1 min en un baño a 42 °C
5. Se dejó la mezcla en hielo durante 1 min
6. Se añadió 1 ml de medio LB
7. Se incubaron las células durante 1 h a 37 °C en un agitador o baño
8. Se sembraron las células en placas de LB adicionadas con el antibiótico correspondiente
9. Se dejaron las placas crecer 24 h a 37 °C en una estufa

- **IPTG (solución stock de 1M preparado en H₂O MilliQ estéril): Concentración final de 1 mM en las placas de medio sólido**
- **X-Gal (solución stock de 20 mg/ml preparado en DMSO): Concentración final de 0,2 mg/ml en las placas de medio sólido**

Los distintos cebadores que se utilizaron fueron diseñados en función del fragmento a amplificar. Los cebadores que se han utilizado en la presente Tesis Doctoral para la realización de PCRs convencionales se detallan en la Tabla 12.

Tabla 12. Cebadores diseñados para la amplificación y secuenciación del ADN. Las letras subrayadas muestran la secuencia introducida de reconocimiento de la enzima de restricción

Cebador	5´-Secuencia-3´	Nº de bases	Tm (°C)	% GC	Uso
16F27	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	20	51	47	Amplificación del ARNr 16S bacteriano, a partir de ADN genómico.
16R1488	CGGTTACCTTGTTAGGACTTC ACC	24	58	50	
Lip1F	GCGCCATGGTTAAAATAGAC GGCGTTTTCTCA	32	65	47	Amplificación del ORF (incluido codón de inicio) del candidato 1 lipasa/esterasa a partir del ADN genómico de <i>Terribacillus</i> sp. AE2B 122. Genera sitio de restricción <i>NcoI</i> y <i>XhoI</i>
Lip1R	GCGCTCGAGTGGCCAGCGCT TTAGGAA	27	68	62	
Lip2F	GCGCCATGGTTCAAAAATGG ATTTTTATCGGA	32	63	41	Amplificación del ORF (incluido codón de inicio) del candidato 2 lipasa/esterasa a partir del ADN genómico de <i>Terribacillus</i> sp. AE2B 122. Genera sitio de restricción <i>NcoI</i> y <i>XhoI</i>
Lip2R	GCGCTCGAGCTTACGTTCTG CCGTAAAATA	30	65	50	
Lip3F	GCGCCATGGTTGGATTGAAT CCAAAAATACAG	32	63	44	Amplificación del ORF (incluido codón de inicio) del candidato 3 lipasa/esterasa a partir del ADN genómico de <i>Terribacillus</i> sp. AE2B 122. Genera sitio de restricción <i>NcoI</i> y <i>XhoI</i>
Lip3R	GCGCTCGAGTTTATACAAAG CTTGTCTCAG	30	62	47	
Lip4F	GCGCCCGGGTTGCGGAGAAA AAGAGTGTGG	30	70	63	Amplificación del ORF (incluido codón de inicio) del candidato 4 lipasa/esterasa a partir del ADN genómico de <i>Terribacillus</i> sp. AE2B 122. Genera sitio de restricción <i>SmaI</i> y <i>XhoI</i>
Lip4R	GCGCTCGAGTTCCGAATGTG CTTGCAAAAA	30	66	50	

Cebador	5´-Secuencia-3´	Nº de bases	Tm (°C)	% GC	Uso
Lip5F	GCGCCATGGTTCAAAAAAGA AAGATTTACCTG	32	62	41	Amplificación del ORF (incluido codón de inicio) del candidato 5 lipasa/esterasa a partir del ADN genómico de <i>Terribacillus</i> sp. AE2B 122. Genera sitio de restricción <i>NcoI XhoI</i>
Lip5R	GCGCTCGAGTTCATCATCTTC CTGTATAAC	28	61	47	
Lip6F	GCGCCATGGTTGAGATACAT TCATCTGAGTCT	32	64	47	Amplificación del ORF (incluido codón de inicio) del candidato 6 lipasa/esterasa a partir del ADN genómico de <i>Terribacillus</i> sp. AE2B 122. Genera sitio de restricción <i>NcoI y XhoI</i>
Lip6R	GCGCTCGAGTATACAGCTTC TCCCGAATTG	30	65	53	
Lip7F	GCGCCCGGGAGAAAATGTAA ACAAATTACGCTT	33	65	45	Amplificación del ORF (incluido codón de inicio) del candidato 7 lipasa/esterasa a partir del ADN genómico de <i>Terribacillus</i> sp. AE2B 122. Genera sitio de restricción <i>SmaI y XhoI</i>
Lip7R	GCGCTCGAGATTTAGTAGAG CCTCTTTAATATG	33	61	42	
Lip8F	GCGCCCGGGCAACAACCTTC TAAAGTA	27	64	52	Amplificación del ORF (incluido codón de inicio) del candidato 8 lipasa/esterasa a partir del ADN genómico de <i>Terribacillus</i> sp. AE2B 122. Genera sitio de restricción <i>SmaI y XhoI</i>
Lip8R	GCGCTCGAGAAGTCTGCTTT TTAAGAATTGATA	33	62	39	
MAO346	AGAGGAGGTATATACATGAAA ATAGACGGCGTTTTCTCAG	40	63	40	Amplificación del promotor T7-RBS-codón inicio (ATG)-ORF de la lipasa-codón stop del candidato 1 lipasa/esterasa a partir del clon 2 pGEMT-lip1
MaO347	CCAAGGGGTTATGCTAGTTAT GGCCAGCGCTTTAGGAAGTG C	42	70	52	
MAO348	AGAGGAGGTATATACATGGTT CAAAAATGGATTTTTATCG	40	60	33	Amplificación del RBS-codón inicio (ATG)-ORF de la lipasa-codón stop del candidato 2 lipasa/esterasa a partir del clon 4 pGEMT-lip2
MAO349	CCAAGGGGTTATGCTAGTTA CTTACGTTCTGCCGTAATA T	42	65	40	

Cebador	5´-Secuencia-3´	Nº de bases	Tm (°C)	% GC	Uso
MAO350	AGAGGAGGTATATACATGGG ATTGAATCCAAAATACAGG	40	62	38	Amplificación del RBS-codón inicio (ATG)-ORF de la lipasa-codón stop del candidato 3
MAO351	CCAAGGGGTTATGCTAGTTAT TTATACAAAGCTTGCTCAGC	42	64	40	lipasa/esterasa a partir del clon 3 pGEMT-lip3
MAO352	AGAGGAGGTATATACATGTTG CGGAGAAAAGAGTGTGGA	40	65	43	Amplificación del RBS-codón inicio (ATG)-ORF de la lipasa-codón stop del candidato 4
MAO353	CCAAGGGGTTATGCTAGTTAT TCCGAATGTGCTTGCAAAAA	42	66	40	lipasa/esterasa a partir del clon 5 pGEMT-lip4
MAO354	AGAGGAGGTATATACATGCA AAAAGAAAGATTTACCTGA	40	61	33	Amplificación del RBS-codón inicio (ATG)-ORF de la lipasa-codón stop del candidato 5
MAO355	CCAAGGGGTTATGCTAGTTAT TCATCATCTTCTGTATAACG	42	64	40	lipasa/esterasa a partir del clon 1 pGEMT-lip5
MAO356	AGAGGAGGTATATACATGGA GATACATTCATCTGAGTCTA	40	61	38	Amplificación del RBS-codón inicio (ATG)-ORF de la lipasa-codón stop del candidato 6
MAO357	CCAAGGGGTTATGCTAGTTAT ATACAGCTTCTCCCGAATTGC	42	66	45	lipasa/esterasa a partir del clon 1 pGEMT-lip6
MAO358	AGAGGAGGTATATACATGAG AAAATGTAAACAAATTACGC	40	60	33	Amplificación del RBS-codón inicio (ATG)-ORF de la lipasa-codón stop del candidato 7
MAO359	CCAAGGGGTTATGCTAGTTAA TTTAGTAGAGCCTCTTAATA	42	62	36	lipasa/esterasa a partir del clon 3 pGEMT-lip7
MAO360	AGAGGAGGTATATACATGGG GCAACAACCTTTCTAAAGTAA	40	63	38	Amplificación del RBS-codón inicio (ATG)-ORF de la lipasa-codón stop del candidato 8
MAO361	CCAAGGGGTTATGCTAGTTAA AGTCTGCTTTTAAAGAATTGA	42	63	36	lipasa/esterasa a partir del clon 6 pGEMT-lip8
MAO362	GAAATTAATACGACTCACTAT AGGGAGAGGAGGTATATAC	40	60	38	Amplificación del promotor T7-RBS-codón inicio (ATG)-ORF de la lipasa-codón stop-Terminador T7 , a partir de las PCRs MAO346/347-MAO360/MAO361 y MAO363/MAO364

Cebador	5´-Secuencia-3´	Nº de bases	Tm (°C)	% GC	Uso
MAO363	TAACTAGCATAACCCCTTGG	20	51	45	Amplificación del terminador T7 a partir de pET-15b del kit ExiProgen™ EC1 Protein Synthesis
MAO364	TTTCAGCAAAAAACCCCTC	19	51	42	

Para la amplificación de fragmentos de ADN se llevó a cabo el método de PCR siguiendo las indicaciones descritas en el manual de Sambrook y Russell (2001). Las reacciones se realizaron en un volumen total de 50 µl, utilizando tubos Eppendorf de 0,2 ml estériles y con ayuda de un termociclador.

La enzima utilizada para amplificaciones fue la *Taq* ADN polimerasa (5-PRIME). En aquellos casos en los que fue necesario disminuir los posibles errores en la amplificación, se empleó *Pfu* ADN polimerasa (Stratagene) que proporciona una alta fiabilidad de copia en la reacción de polimerización. Para la amplificación de fragmentos de ADN que posteriormente se ligaron en pGEM-T, se utilizó AcuPrime Taq High Fidelity que deja extremos de adenina. El programa general de PCR utilizado para la amplificación de ADN (Figura 10) fue modificado en lo referente a la temperatura de hibridación de los cebadores (generalmente 5°C menos que la T_m de los cebadores, sin bajar de los 50°C) y al tiempo de elongación, dependiendo del tamaño de los fragmentos a amplificar (1 minuto/Kilobase). En general, tras una desnaturalización previa del ADN a 95 °C durante 1 minuto, se aplicaron 30 ciclos constituidos por tres etapas: desnaturalización, hibridación de los cebadores y extensión. La reacción terminó con un ciclo de extensión a 72 °C durante 10 minutos con el fin de permitir la elongación de los productos de reacción. La reacción, una vez finalizada, se mantenía a 4°C si no se iba a utilizar en el momento. En el caso de la AcuPrime Taq High Fidelity, la temperatura de elongación fue de 68°C.

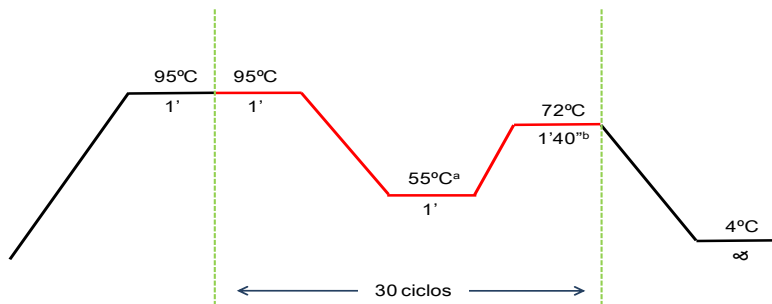


Figura 10. Condiciones de las reacciones de PCR. ^aLa temperatura de hibridación se modificó en cada caso 5 °C por debajo de la T_m de los cebadores utilizados. ^bEl tiempo de elongación fue aproximadamente de un minuto por Kb

Los productos obtenidos en cada reacción se sometieron a electroforesis en geles de agarosa para comprobar si se había producido la amplificación del fragmento deseado.

A continuación se muestran los componentes de la mezcla de reacción para PCR y las concentraciones finales a las que se utilizaron generalmente (Tabla 13).

Tabla 13. Componentes de la mezcla de reacción de PCR

Componente de la mezcla*	Cantidad*
Tampón 10x con Mg^{+2}	5,0 μ l
dNTPs (2,5 mM cada dNTPs)	4,0 μ l
Cebador 1 (12 μ M)	2,5 μ l
Cebador 2 (12 μ M)	2,5 μ l
Taq ADN polimerasa	1,25 U
ADN (1 mg/ μ l)	1,0 μ l
H ₂ O MilliQ estéril	hasta 50 μ l

*En cada caso hay que tener en cuenta las indicaciones del fabricante

En los casos de comprobación de transformantes, se utilizó el método de PCR de colonia. Para esto se tomó una muestra de biomasa de la colonia en 50 μ l de H₂O MilliQ estéril, se hirvió 10 min en un baño y se centrifugó 5 min a 9000 rpm.

Se utilizó 1 μ l de este sobrenadante como molde para la PCR, para la que se utilizó la enzima iTaq y el mismo programa de amplificación descrito en la Figura 10.

3.2.5.3. Secuenciación y análisis del ADN

Secuenciación de fragmentos amplificados de ADN

La secuenciación de los diferentes fragmentos de ADN amplificados en la presente Tesis Doctoral ha sido realizada por la empresa Stab Vida (Oeiras, Portugal), usando un secuenciador modelo 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems). La secuenciación ha sido realizada mediante el método de Sanger (Sanger y col., 1977). Los oligonucleótidos empleados para la secuenciación se indican en la Tabla 12.

Análisis de los fragmentos secuenciados de ADN

Los cromatogramas de las secuencias de ADN se visualizaron con el programa Chromas Pro versión 1.5. Para el análisis de las secuencias de ADN se procedió a la comparación de éstas con las secuencias disponibles en las bases de datos (EMBL, GenBank, DDBJ y RDB) con la ayuda del programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul y col., 1997), alojado en el servidor del NCBI (*Nacional Center for Biotechnology Information*).

Análisis de la secuencia del ARNr 16S y construcción de árboles filogenéticos

El ADN de las bacterias fue aislado siguiendo el protocolo estándar que se explica en el apartado 3.2.5.1. (Extracción de ADN genómico). El ADN total aislado se usó como molde para la amplificación del ARNr 16S mediante PCR, usando los cebadores universales diseñados para bacterias 16SF27 y 16SR1488 (Tabla 12) (Lane, 1991). Se secuenció un fragmento de 650 pbs del ARNr 16S amplificado, correspondiente a las posiciones de la base 39 a la 689 del gen ARNr 16S de *E. coli*. Esa secuencia parcial se alineó con la secuencia del gen ARNr 16S más similar en la base de datos GenBank, usando el algoritmo de búsqueda BLASTN y con el software disponible en el *Ribosomal Database Project* (RDB). Se realizó un alineamiento múltiple de secuencias utilizando las secuencias más similares encontradas en GenBank, el software utilizado fue Clustal W (Thompson y col., 1997).

Los árboles filogenéticos se obtuvieron usando el software MEGA4 (Tamura y col., 2007) con el método Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987). Los datos se sometieron a un proceso de *bootstrap* de 500 repeticiones para asegurarnos de la fiabilidad de cada rama del árbol.

Las distancias evolutivas se calcularon usando el método de Maximum Composite Likelihood (Tamura y col., 2004) y se muestran como número de sustituciones de bases por sitio. Para algunos organismos elegidos, se secuenció el ARNr 16S completo y al igual que con la secuencia parcial, se comparó con las secuencias de la base de datos GenBank.

Secuenciación de ADN genómico de *Terribacillus* sp. AE2B 122

La secuenciación y ensamblaje del genoma se realizó por la empresa BGI-HongKong Co., Ltd., utilizando una tecnología de secuenciación de última generación (NGS de sus siglas en inglés “*Next Generation Sequencing*”) en un secuenciador Illumina de alto rendimiento, con una estrategia de 2 x 90 pbs (es decir, 90 pbs por los dos extremos).

Para el ensamblaje de los fragmentos, primero se filtraron las secuencias para eliminar las de baja calidad, y luego se eliminaron las secuencias correspondientes a los oligonucleótidos utilizados en la construcción de la librería genética. Se utilizó el algoritmo SOAP denovo versión 1.05. Los resultados fueron ensamblados localmente y optimizados según los extremos emparejados y las relaciones de solapamiento, mapeando las lecturas para formar *contigs* y *supercontigs*.

La anotación automática fue realizada por el profesor Gabriel Gutiérrez Pozo (Departamento de Genética, Universidad de Sevilla) utilizando el servidor RAST, el cual realiza anotaciones rápidas utilizando tecnología de subsistemas (Aziz y col., 2008).

Análisis del genoma de *Terribacillus* sp. AE2B 122

Para análisis más detallados de las lipasas candidatas identificadas en el genoma de *Terribacillus* sp. AE2B 122, se utilizaron herramientas bioinformáticas tanto de los servidores NCBI como EXPASY. Los programas Blastp, InterProScan y MyHits se utilizaron para la búsqueda de dominios y familias. Los programas PSORTb, LipoP y signal P se utilizaron para predecir si las proteínas eran intracelulares o extracelulares,

LipoP y signal P se utilizaron más concretamente para la predicción de la presencia de péptido señal en las proteínas candidatas.

3.2.6. Extracción y análisis del ARN

3.2.6.1. Extracción del ARN

Para la extracción de ARN de las células bacterianas se siguió el método de extracción con trizol que se indica a continuación:

1. Homogenizado:
 - 1.1. Resuspender las células bacterianas en 100 µl de lisozima (3 mg/ml en tampón Tris-EDTA-Glucosa) y mantener a T^a ambiente 15-30 min
 - 1.2. Congelar y descongelar la muestra, añadir 1 ml de trizol y pipetear varias veces para homogeneizar
2. Separación en dos fases:
 - 2.1. Incubar 5 min a temperatura ambiente para permitir la disociación completa de proteínas
 - 2.2. Centrifugar a 4°C durante 10 min a 13000 rpm y recoger el sobrenadante en un eppendorf limpio. Así se elimina el ADN genómico
 - 2.3. Añadir el mismo volumen de una mezcla fenol:cloroformo (1:1), mezclar bien y centrifugar 5 min a 4°C y 13000 rpm
 - 2.4. Recoger la fase superior y pasar a un eppendorf nuevo
 - 2.5. Repetir los dos pasos anteriores hasta que desaparezca la interfase
 - 2.6. Añadir el mismo volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y mezclar con vortex
 - 2.7. Centrifugar a 4°C, 5 min y 13000 rpm
3. Precipitación del ARN:
 - 3.1. Recoger la fase superior y añadir 2,5 volúmenes de etanol 100% y 1/10 de acetato sódico 3 M pH 5,2
 - 3.2. Precipitar a -20°C durante 30 min
 - 3.3. Centrifugar 30 min a 13000 rpm y 4°C
 - 3.4. Lavar el pellet de células con 400 µl de etanol al 70% invirtiendo manualmente y centrifugando 5 min a 4°C y 13000 rpm
 - 3.5. Eliminar el etanol y secar a T^a ambiente

3.6. Resuspender en 50 µl de agua destilada estéril

3.2.6.2. Análisis del ARN

La pureza del ARN extraído se comprueba mediante electroforesis en gel de agarosa y midiendo la ratio de las absorbancias a 230 y 280 nm y a 260 y 280 nm en un Nanodrop, donde además se obtiene la concentración del mismo ($Abs_{260nm} = 1,0$ equivale a 40 µg / ml).

3.2.6.3. Análisis del ARN por RT-qPCR

Los niveles de expresión de los genes se cuantificaron por RT-qPCR en tiempo real. Para evitar interferencias con ADN contaminante en las muestras de ARN, éstas se trataron con ADNasa libre de ARNasas (Promega), según las indicaciones del fabricante. Tras el tratamiento, las muestras se ajustaron a 12,5 ng/µl para ser utilizadas en la reacción de RT-qPCR con el kit One Step SYBR PrimeScript RT-PCR (Takara Bio Inc.) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El equipo utilizado fue el LightCycler 480 y el protocolo el que se indica a continuación:

- Un ciclo de Retrotranscripción (RT):
 1. 5 minutos a 42°C y una rampa de temperatura de 4,8°C/seg.
 2. 10 segundos a 95°C y una rampa de temperatura de 4,8°C/seg.
- 40 ciclos de PCR:
 1. 5 segundos a 95°C y una rampa de temperatura de 4,8°C/seg.
 2. 20 segundos a 60°C y una rampa de temperatura de 2,5°C/seg.
- 1 ciclo de disociación:
 1. 1 segundo a 95°C y una rampa de temperatura de 4,8°C/seg.
 2. Bajada de temperatura hasta 65°C con una rampa de temperatura de 0,11°C/seg.
 3. 1 segundo a 95°C y una rampa de temperatura de 4,8°C/seg.

Los cebadores utilizados en la RT-qPCR fueron los indicados en la Tabla 14. El diseño de los mismos se llevó a cabo seleccionando una zona de los genes que no correspondiera con un dominio conservado en los mismos, para que no se generen falsos positivos.

Esta región seleccionada del gen se introduce en un programa de diseño de cebadores utilizando el software Primer Express, que permite obtener una lista de parejas de cebadores óptimos.

Tabla 14. Cebadores utilizados en la RT-qPCR

Cebador	5´-Secuencia-3´	Nº de bases	Gen
gyrA122F	AATCGAAAAAGGCGAATGGA	20	Subunidad A de la girasa
gyrA122R	TCCGTTTGAAATCCCTTGTT	21	
rpoB122F	AGAATATCTTGGAGCCGCATGA	22	Subunidad β de la ADN polimerasa
rpoB122R	TAGTGTACGTTCCGCCTTCTGGAT	23	
RTlip1.122F	GTGATTGCCGCAGATGTAACC	21	Gen de la lipasa/esterasa candidata 1, <i>te1</i>
RTlip1.122R	GCCCGTGCTACTGGGAAAC	19	
RTlip2.122F	GGCAACCGTATCACCGATCTAG	22	Gen de la lipasa/esterasa candidata 2, <i>te2</i>
RTlip2.122R	CTCAAACATCGTTGATTCCAA	22	
RTlip3.122F	TGAGCAATTCGCGATCAAG	20	Gen de la lipasa/esterasa candidata 3, <i>te3</i>
RTlip3.122R	GCAGCGTCCGACCATTTAAT	20	
RTlip4.122F	ACGTCCGATTATCCGCCTACT	21	Gen de la lipasa/esterasa candidata 4, <i>te4</i>
RTlip4.122R	TCCACTCCTGCCTTCTCAAGTT	22	
RTlip5.122F	TTACAATCGGCGCCAATGAT	20	Gen de la lipasa/esterasa candidata 5, <i>te5</i>
RTlip5.122R	TCGTTCCCTATAAGCTGGCATA	22	
RTlip6.122F	ACTGCAGCAGTTCCGATGTTAC	22	Gen de la lipasa/esterasa candidata 6, <i>te6</i>
RTlip6.122R	TTGCTCGTTCAGCCAAGACTT	21	
RTlip7.122F	AGCAAGCAAGGGCATCAAGA	20	Gen de la lipasa/esterasa candidata 7, <i>te7</i>
RTlip7.122R	TGTGCCACGATGTTTACTTTATCG	24	
RTlip8.122F	ATGAGCGCAAATTGCAGAGA	20	Gen de la lipasa/esterasa candidata 8, <i>te8</i>
RTlip8.122R	AAGTCGGATGGCGCATAAAA	20	

3.2.7. Obtención de fracciones celulares bacterianas

Sobrenadante

El sobrenadante procedente de los distintos cultivos bacterianos se obtuvo a partir de 25 ml, 100 ml o 2 L de los mismos tras incubarlos durante 4, 7, 16, 20, 24, 48 o 72 horas. Los cultivos de 25 y 100 ml se centrifugaron a 3800 x g y 4 °C durante 20 minutos en una centrífuga Beckman Coulter modelo Allegra X-22R. Para los cultivos de 2 L se utilizó una centrífuga preparatoria Beckman modelo J2-21M durante 1h a 4000 x g y 4°C, recogiendo el sobrenadante libre de células.

En el caso de las estirpes de *E. coli* BIVU111 expresando las lipasas de *Terribacillus*, se siguió un protocolo diferente y para la obtención del sobrenadante se centrifugaron 50 mL de cultivo a 5000 x g y 4°C durante 10 min.

Fracción intracelular

La fracción citoplasmática se obtuvo mediante rotura de las células bacterianas con ultrasonidos. Para ello, las células obtenidas tras recoger la fracción extracelular, se resuspendieron en un volumen de tampón fosfato potásico 0,05 M pH 7,6 igual al volumen de cultivo del que provenían y se sonicaron en un sonicador Branson Sonifier 250, utilizando 6 pulsos de 10 segundos de sonicación, a 4 de intensidad, y 50 segundos de reposo en hielo. Por último se centrifugó 10 minutos a 4 °C y 4000 rpm para eliminar la fracción insoluble, seleccionando el sobrenadante que constituye la fracción intracelular.

Para las estirpes de *E. coli* BIVU111 expresando las lipasas de *Terribacillus* sp. AE2B 122, la fracción intracelular (citoplasmática) se obtuvo mediante lisado de las células bacterianas en un homogeneizador. Para ello, las células obtenidas previamente tras recoger la fracción extracelular, se resuspendieron en un volumen de 20 mL de PBS (20 mM fosfato potásico, pH 7,6, 150 mM NaCl) y se lisó en un homogeneizador PANDA (Gea Niro Soavi) a unos 800 bares, recogiendo un volumen que varía entre ensayo (47-50 ml). La fracción intracelular soluble se obtuvo centrifugando 10 ml del lisado celular a 10000 x g, 15 min y 4°C, recogiendo el sobrenadante (intracelular soluble) y el precipitado celular (intracelular insoluble).

3.2.8. Ensayos de actividad lipolítica

3.2.8.1. Aislamiento de microorganismos con actividad lipolítica (hidrólisis de tributirina en placa)

Para seleccionar microorganismos lipolíticos las muestras de suelo se sembraron en medios sólidos suplementados con 0,5% de tributirina. Para visualizar la actividad lipolítica, los medios usados fueron LB (Luria Bertani médium), Potato Dextrose Broth (PDB) (Difco), 9K A, 9K G (ver Tabla 10). Tras inocular las placas, estas se incubaron a 30°C durante 4-7 días. Aquellos microorganismos que formaron un halo alrededor de la colonia, lo que indicaba actividad lipolítica, fueron crecidos en placas que contenían medios no selectivos (sin tributirina), LB (bacteria), PDB (hongos) o YPD (levadura), posteriormente la actividad lipolítica se confirmó sembrando nuevamente las colonias aisladas en el medio correspondiente conteniendo 0,5% de tributirina.

3.2.8.2. Ensayo actividad hidrolítica con MUF-Butirato (zimograma y placa multipocillo)

Para detectar actividad hidrolítica sobre el sustrato MUF-butirato en geles de acrilamida, se prepararon muestras de las distintas fracciones celulares con tampón de carga 6x SDS loading buffer sin agente reductor. Estas muestras se calentaron a 70°C, 10 min y se cargaron en un gel de poliacrilamida al 12.5%. La electroforesis se realizó a 175 V y al finalizar se llevó a cabo un tratamiento de replegamiento (Brault y col., 2012), que se describe a continuación:

1. Lavar 2 veces el gel durante 15 min en tampón de replegamiento, con agitación suave.
2. Incubar en agitación suave, durante 30 min, con una solución de 20 mM Tris-HCl pH 8.8 y 2% (v/v) triton X-100.
3. Eliminar el triton X-100 lavando 2 veces, durante 5 min, en agua desionizada.
4. Añadir sobre el gel una solución de 20 mM Tris-HCl pH 8.0 conteniendo 200 μ M de MUF-butirato (4-metil-umbeliferil (MUF)-butirato, SIGMA, Ref. 19362-1G), preparada a partir de una solución de MUF-butirato a 100 mM en DMSO (SIGMA, Ref. D8418-250ML).

5. Tras 5 minutos de incubación, detectar la señal en el gel mediante excitación con luz UV en Chemidoc XRS (Bio-Rad).

- **Tampón de replegamiento: 20 mM Tris-HCl pH 8.8, 2% caseína**
- **6x SDS loading buffer sin agente reductor: 0.35 M Tris-HCl (pH 6.8), 10.28% (p/v) SDS, 36% (v/v) glicerol, 0.012% (p/v) bromophenol blue.**

Para detectar actividad hidrolítica del sustrato MUF-butirato en placa multipocillo, se mezclaron 50 μ L de las distintas fracciones celulares con 50 μ L de sustrato MUF-butirato preparado a una concentración de 200 μ M en 20 mM Tris-HCl, pH 8,0. Tras la incubación de la mezcla durante 25 minutos, se expone la placa a luz UV y se toma una foto en Chemidoc XRS (Bio-Rad).

3.2.8.3. Ensayo de la actividad transesterificadora usando *para*-nitrofenol palmitato (*p*-NPP)

Para la selección de microorganismos capaces de realizar reacciones de transesterificación se desarrolló un método colorimétrico basado en un método ya publicado (Teng & Xu, 2007), con algunas modificaciones. El método consiste en la transesterificación del *para*-nitrofenol palmitato (*p*-NPP) con etanol para liberar el compuesto de color amarillo *para*-nitrofenol (*p*-NP) (Figura 11). Esta coloración amarilla es cuantificable espectrofotométricamente en un rango de 348 a 420 nm (Stuer y col., 1986; Wilhelm y col., 1999).

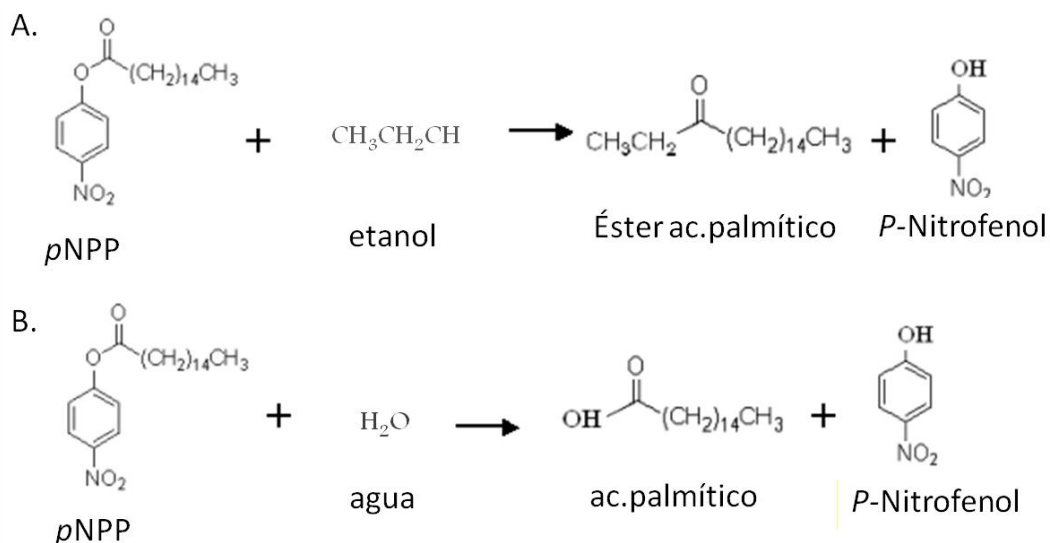


Figura 11. Esquema de la reacción de transesterificación del *p*-NPP con etanol en condiciones no acuosas (A). Esquema de la reacción de hidrólisis del *p*-NPP en condiciones acuosas (B)

Para el ensayo de la actividad transesterificadora, se tomaron 0,5-1,8 ml del sobrenadante o de la fracción intracelular del cultivo seleccionado y se liofilizaron. Esta fracción celular liofilizada, se mezcló con 1 ml de 10 mM de *p*-NPP (en *n*-hexano) y 60 μl de etanol absoluto en tubos eppendorf de 2 ml con cierre seguro y fueron incubados a 37 °C durante 4-16 h en agitación (200 rpm). Se prepararon también dos tipos de controles negativos:

- 1- El primero, mezclando etanol absoluto y *p*-NPP, donde el posible *p*-NP liberado provendría de actividad química y no biológica, ya que no hay fracción liofilizada en este control negativo.
- 2- Y un segundo control de actividad hidrolítica de las lipasas, mezclando *p*-NPP y fracción liofilizada (sin etanol absoluto), donde el posible *p*-NP liberado no provendría de transesterificación, ya que no hay etanol, sino de hidrólisis mediante la solución acuosa de NaOH, añadida en el momento de la extracción de *p*-NP.

Tras 4-16 horas de reacción, se dejó reposar la muestra durante 10 minutos para permitir que la lipasa decantase hasta el fondo del tubo. Se cogieron 25 µl del sobrenadante y se extrajo con 1 ml de NaOH 0,05 M en un tubo eppendorf de 1,5 ml en hielo. El *p*-NP producido durante la reacción de transesterificación se extrajo en la fase acuosa alcalina que se forma al adicionar la solución de NaOH. Finalmente esta mezcla se pasó a una cubeta de 1 ml y se midió su absorbancia a 410 nm, usando un espectrofotómetro Beckman DU 640.

Se utilizaron tres formas de cuantificar la actividad transesterificadora:

- 1- Actividad transesterificadora específica de proteína soluble. En este caso las unidades de actividad se expresaron como µmoles de *p*-NP liberado por cada hora de reacción y mg de proteína soluble. La concentración de proteínas solubles corresponde a la concentración de proteína medida en la mezcla de la reacción de transesterificación. La fórmula utilizada fue la siguiente:

$$\text{Actividad} = (\text{Abs}_{410\text{nm}} \times \text{fd}) / \text{Ce} \times 1000 \times \text{Vt} / \text{h} / \text{Cps} \times \text{Vt}$$

-**Abs_{410nm}**: absorbancia (410 nm) de los ensayos de transesterificación.

-**fd**: factor de dilución.

-**Ce**: coeficiente de extinción molar del producto *p*-NP a 410 nm (17600 M⁻¹ cm⁻¹).

-**1000**: 1000 es un factor de multiplicación utilizado para la conversión de la concentración de *p*-NP de M a mM.

-**Vt**: volumen total de la reacción de transesterificación (1,06 ml).

-**Cps**: concentración de proteína soluble (mg/ml).

- 2- Actividad transesterificadora específica de proteína de fracción utilizada. En este caso, las unidades de actividad se expresaron como µmoles de *p*-NP liberado por cada hora de reacción y mg de proteína presente en la fracción utilizada (extracelular, intracelular total e intracelular soluble) en el ensayo antes de ser liofilizada. La fórmula utilizada fue la siguiente:

$$\text{Actividad} = (\text{Abs}_{410\text{nm}} \times \text{fd}) / \text{Ce} \times 1000 \times \text{Vt} / \text{h} / \text{Cpf} \times \text{Vf}$$

-**Cpf**: concentración de proteína de la fracción utilizada (mg/ml).

-**Vf**: volumen de fracción liofilizada utilizada en el ensayo.

- 3- Actividad transesterificadora total. En este caso las unidades de actividad se expresaron como μ moles de *p*-NP liberado por cada hora de reacción y ml de fracción utilizada en el ensayo antes de ser liofilizada. La fórmula utilizada fue la siguiente:

$$\text{Actividad} = (\text{Abs}_{410\text{nm}} \times \text{fd}) / \text{Ce} \times 1000 \times \text{Vt} / \text{h} / \text{Vf}$$

3.2.8.4. Ensayo de actividad hidrolítica del *p*-NPP

Al igual que la transesterificación, la hidrólisis del éster *p*-NPP da lugar a una coloración amarilla debida al *p*-nitrofenol liberado por la hidrólisis de dicho éster.

La reacción de hidrólisis se llevó a cabo mezclando 0,1 ml de fracción celular o de fracción proteica, con 0,1 ml de *p*NPP 10 mM y 0,8 ml de tampón fosfato potásico 0,05 M y pH 7,6. La mezcla se dejó de 5–20 h a 37 °C y se midió la absorbancia a 410 nm para comprobar la cantidad de *p*NP liberado por hidrólisis.

Para la hidrólisis se realizaron tres tipos de cuantificación de actividad hidrolítica, la actividad hidrolítica específica de proteína soluble y de proteína de fracción y la actividad hidrolítica total de proteína de fracción. Para los cálculos se utilizaron las siguientes fórmulas:

- 1- Actividad hidrolítica específica de proteína de fracción:

Las unidades se expresan como μ moles de producto (*p*NP) por cada hora de reacción y mg proteína presente en la fracción celular (extracelular, intracelular total e intracelular soluble) utilizada en el ensayo de reacción de hidrólisis.

$$\text{Actividad} = (\text{Abs}_{410\text{nm}}) / \text{Ce} \times 1000 \times \text{Vt} / \text{h} / \text{Cpf} \times \text{Vf}$$

4- Actividad hidrolítica específica de proteína soluble:

Las unidades se expresan como μ moles de producto (ρ NP) por cada hora de reacción y mg proteína soluble en la mezcla de reacción de hidrólisis.

$$\text{Actividad} = (\text{Abs}_{410\text{nm}}) / \text{Ce} \times 1000 \times \text{Vt} / \text{h} / \text{Cps} \times \text{Vf}$$

5- Actividad hidrolítica total:

Las unidades se expresan como μ moles de producto (ρ NP) por cada hora de reacción y ml de fracción celular utilizada en el ensayo de reacción de hidrólisis.

$$\text{Actividad} = (\text{Abs}_{410\text{nm}}) / \text{Ce} \times 1000 \times \text{Vt} / \text{h} / \text{Vf}$$

3.2.8.5. Determinación de la concentración de proteínas

Para el cálculo de concentración de proteínas de las distintas fracciones y soluciones de proteínas utilizadas en este trabajo, se utilizó el reactivo Bradford (Biorad Protein Assay, Microassay Procedure). Se prepararon las muestras mezclando 100 μ l de fracción o solución de proteínas con 700 μ l de H₂O destilada y 200 μ l de reactivo Bradford. A los 10 minutos se midió su absorbancia a 595 nm. Para poder realizar el cálculo de la concentración de proteínas, se realizó una recta patrón mezclando 0 μ l, 20 μ l, 40 μ l, 60 μ l, 80 μ l, 100 μ l y 120 μ l de albumina de suero bovino (BSA) 0,1 mg/ml con H₂O destilada hasta 800 μ l, y 200 μ l de reactivo Bradford, resultando en una concentración final de 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 μ g/ml de BSA, respectivamente. Tras mezclarlos bien y esperar 10 minutos, se midió su absorbancia a 595 nm, se compararon las concentraciones conocidas de cada punto con las absorbancias medidas y se construyó una recta patrón. Las absorbancias medidas de las muestras se compararon con la fórmula de la recta patrón y se calcularon así las concentraciones de proteína de cada muestra. Si los valores de absorbancia obtenidos para la muestra problema no se encontraban en el rango lineal de la recta patrón, se realizaban diluciones de la muestra hasta conseguir que los valores obtenidos estuvieran en el rango adecuado.

3.2.9. Análisis de Biodiésel

3.2.9.1. Producción de Biodiésel a escala de laboratorio, cinética y reutilización

Para la producción de Biodiésel en el laboratorio, se utilizó el sobrenadante obtenido según el método explicado en el apartado 3.2.7. Para esto, se utilizó un cultivo de 5 ml de cada una de las bacterias lipolíticas seleccionadas, crecido durante toda la noche, para inocular un matraz con 25 ml de LB con un 2 % de tributirina hasta una DO_{600nm} final de 0,1. Los matraces inoculados fueron cultivados durante 3 días a 30°C y agitación rotacional de 200 rpm. Los cultivos se centrifugaron y se obtuvo el volumen completo del sobrenadante. Los sobrenadantes se trataron utilizando dos procedimientos antes de ser utilizados en las reacciones de transesterificación:

A. Sobrenadante no procesado: se liofilizó, utilizando todo el extracto liofilizado directamente en una reacción de transesterificación.

B. Sobrenadante procesado: Con la intención de eliminar sales, otros componentes del medio y la tributirina del sobrenadante se realizó un procedimiento de concentración seguido de una diálisis. Así, los sobrenadantes (25 ml de cada cultivo) se concentraron en membranas de diálisis, a una temperatura de 4°C, durante toda la noche (tubo de membrana de diálisis, 12 KDa, D9527-100FT, SIGMA ALDRICH) usando polietilenglicol (PEG, 8 KDa, Sigma), luego se dializaron en tampón fosfato potásico 0,05 M (pH 7,6), realizando cuatro lavados de 30 minutos. Finalmente el sobrenadante concentrado y dializado resultante se liofilizó para ser utilizado en una reacción de transesterificación.

La reacción de transesterificación se realizó con agitación continua, a 37°C, durante 24 horas. La mezcla contenía 6 ml de aceite de girasol, 1,75 ml de etanol absoluto, 0,05 ml de NaOH 10 N y todo el sobrenadante, procesado o no procesado, procedente de los 25 ml de cultivo inicial. Al mismo tiempo se llevó a cabo un control negativo usando una mezcla de 6 ml de aceite de girasol, 1,75 ml de etanol absoluto y 0,05 ml de NaOH 10 N, sin sobrenadante. Los ésteres etílicos y glicéridos producidos en la reacción de transesterificación se analizaron usando cromatografía de gases (CG) como describiremos más adelante.

Para estudiar la cinética de la reacción, se recogieron muestras a distintos tiempos, tras iniciar la reacción de transesterificación antes descrita, y se analizaron por CG. Para cuantificar la estabilidad de los extractos enzimáticos en la producción de Biodiésel, los productos se centrifugaron, el sobrenadante se descartó y el precipitado se empleó para repetir la reacción de transesterificación y el análisis de CG. Ambos análisis se llevaron a cabo solo con sobrenadantes procesados.

3.2.9.2. Cromatografía de gases (CG)

El método usado para el análisis químico del Biodiésel integra dos métodos oficiales, uno para la detección de ésteres (UNE EN ISO 14103) y otro para la detección de glicéridos (UNE EN ISO 14105), usando cetano (*n*-hexadecano) como patrón interno para cuantificar el contenido de glicerol, ésteres etílicos y mono-, di- y triglicéridos (Verdugo y col., 2010). Con este método modificado se obtiene un análisis completo de la muestra en una única inyección y una sola columna en un tiempo aproximado de 45 minutos, simplificando el proceso y aumentando la velocidad de análisis. Para el análisis se usó un cromatógrafo de gases Varian 430 GG conectado a una columna capilar HT5 (25 m x 0,32 mm, I.D x 0,1 µm, SGE, Supelco) con un detector de ionización por llama (FID) e inyección *splitless*. Para la preparación de la muestra, el producto de la reacción de transesterificación (12,5 µl) se mezcló con 4 ml de una mezcla etanol/diclorometano en proporción 1:1 (v/v) que a su vez contenía 0,1 g del patrón interno (cetano). Para el análisis se inyectaron en el cromatógrafo 0,5 µl de esta muestra preparada.

El resultado se expresó en cantidades relativas de la suma del correspondiente éster etílico de ácido graso (FAEE) y algunos monoglicéridos (MG) de tiempos de retenciones menores (TR > 25 minutos) y la suma de cantidades de otros MG de TR mayores (TR > 25 minutos) y los diglicéridos (DG). El rendimiento se refiere a la cantidad relativa (%) de FAEE + MG (con TR menores) producidos. La conversión incluye la cantidad total (%) de triglicéridos transformados a FAEE, MG y DG. Se realizaron al mismo tiempo reacciones de controles negativos, las cuales sólo contenían una mezcla de aceite, etanol y NaOH. Los experimentos se repitieron al menos dos veces y se mostraron las medias de los resultados. Las condiciones cromatográficas empleadas se resumen en la Tabla 15.

Tabla 15. Condiciones cromatográficas empleadas en la determinación de ésteres etílicos y glicéridos en las muestras de Biodiésel

Gas portador	Helio, flujo 1,5 mL/min
Modo inyección	<i>Splitless</i>
Temperatura inyector	350 °C
Temperatura detector	400 °C
Programa térmico	Desde 90 °C hasta 200 °C a una velocidad de 7°C/min, seguido de otra rampa desde 200 °C hasta 360 °C a una velocidad de 15 °C/min, manteniendo los 360 °C durante 10 minutos.

3.2.9.3. Determinación de la viscosidad

La viscosidad se determinó utilizando un viscosímetro capilar Ostwald-Cannon-Fenske (Proton Routine Viscometer 33200, size 2150), midiendo el tiempo necesario para que un cierto volumen de líquido pase entre dos puntos marcados en el instrumento, colocado en posición vertical (Figura 12). Esto constituye una medida de la amortiguación que sufre el flujo del líquido, como consecuencia del frotamiento interno de sus moléculas, en función de sus viscosidades, siempre que se mantengan constantes las variables que influyen en el proceso, principalmente la temperatura. A partir del tiempo de flujo (t), expresado en segundos, se obtiene la viscosidad cinemática (ν) expresada en centistokes (cSt). Ésta se calcula mediante la fórmula $\nu \times t = C$, donde C es la constante de calibración del sistema de medida en cSt x s, que viene dada por el fabricante del aparato ($0.10698 \text{ mm}^2/\text{s}$, a 40 °C, en este caso).

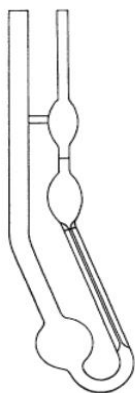


Figura 12. Viscosímetro capilar Ostwald-Cannon-Fenske

Para las medidas de viscosidad se siguió el procedimiento descrito en la Norma Española UNE 55-105-73. La muestra, previamente centrifugada a 3.500 rpm durante 10 minutos, se sumergió en un baño termostático a 40 °C durante 15 minutos, asegurándose de que la temperatura era estable. Posteriormente se introdujo la muestra en el viscosímetro y éste, a su vez, en el baño termostático, cuidando que estuviera situado en posición rigurosamente vertical, con el extremo inferior a una distancia mínima de 2 centímetros del fondo del baño. Se esperó el tiempo necesario para que se estableciera el equilibrio térmico, y una vez alcanzado, mediante un pequeño tubo de goma, se succionó haciendo subir el nivel de la muestra hasta alcanzar unos 5 milímetros por encima de la primera marca del viscosímetro. Se interrumpió la succión, dejando que el líquido descendiera libremente en el instrumento, poniendo en marcha el cronómetro en el momento en que el menisco superior pasó por la marca entre los dos bulbos, y parando el cronómetro en el momento que el menisco alcanzó la segunda marca. Se anotó el tiempo de flujo, expresado en segundos. Se repitió esta operación dos veces.

3.2.10. Ensayos *in vitro* de producción de proteínas

Para este ensayo y el siguiente se transformaron células de *E. coli* DH5 α con los genes de las lipasas/esterasas candidatas clonados en pGEM-T, siguiendo los pasos descritos a continuación:

- 1- Lo primero fue el diseño de los cebadores (Lip1-8F y R) para amplificar los genes candidatos desde el codón de inicio hasta el de terminación (Tabla 12).

- 2- Estos cebadores se utilizaron para la amplificación de ADN genómico de *Terribacillus* sp. AE2B 122, con la enzima AcuPrime Taq High Fidelity que deja extremos de adenina libres para poder ligar posteriormente en pGEM-T. Las amplificaciones se separaron en un gel de agarosa al 0,8 % y las bandas del tamaño esperado se purificaron y ligaron en pGEM-T. Las ligaciones se transformaron en células competentes de *E. coli* DH5 α .
- 3- Los transformantes que formaron colonias blancas se comprobaron mediante PCR de colonia y por restricción. Para la restricción se escogió una diana de restricción dentro del inserto (*Xho*I) y otra del plásmido (*Sph*I) para comprobar la dirección del inserto en el vector. Se eligieron dos clones positivos de cada lipasa candidata y se utilizó el kit **ExiProgenTM EC1 Protein Synthesis Kit (Bioneer)**, con los productos de PCR descritos en la Tabla 16, para sintetizar proteína *in vitro*.

Tabla 16. Tabla de productos de PCR utilizados para la síntesis *in vitro* de proteínas

	PCR1			PCR2		
	Molde	Primers	Producto	Molde	Primers	Producto
Lipasa 1	pGEM-T-Lipase-1	MAO346 MAO347	920 pbs	Producto PCR 1 + producto PCR terminador T7	MAO362 MAO364	982 pbs
Lipasa 2	pGEM-T-Lipase-2	MAO348 MAO349	632 pbs			694 pbs
Lipasa 3	pGEM-T-Lipase-3	MAO350 MAO351	956 pbs			1018 pbs
Lipasa 4	pGEM-T-Easy- Lipase-4	MAO352 MAO353	998 pbs			1060 pbs
Lipasa 5	pGEM-T-Lipase-5	MAO354 MAO355	938 pbs			1000 pbs
Lipasa 6	pGEM-T-Lipase-6	MAO356 MAO357	761 pbs			823 pbs
Lipasa 7	pGEM-T-Easy- Lipase-7	MAO358 MAO359	638 pbs			700 pbs
Lipasa 8	pGEM-T-Easy- Lipase-8	MAO360 MAO361	1010 pbs			1072 pbs
Terminador T7	pET-15b	MAO363 MAO364	57 pbs			

- 4- Los productos de PCR1 (amplificación del ORF de cada lipasa candidata) se utilizaron como moldes en la reacción de amplificación PCR2 (Tabla 16), cuyos productos de amplificación quedarían como **Promotor T7-RBS-ATG-ORF de la lipasa-Stop-Terminador T7**. Los productos de la PCR 2 fueron los utilizados para la síntesis *in vitro* de proteínas. Las reacciones de síntesis *in vitro* de las proteínas se llevaron a cabo con ADN procedente de dos amplificaciones independientes de cada lipasa, excepto de la lipasa 8. En el lugar del duplicado de la lipasa 8 se utilizó la proteína Cloranfenicol Acetil Transferasa (CAT) amplificada para la síntesis *in vitro* de una proteína control.
- 5- De cada producto de la reacción *in vitro* se obtuvieron 0,6 ml, de los que 0,1 ml se utilizaron para la reacción de hidrólisis y 0,5 ml para la de transesterificación. La concentración de proteínas se determinó utilizando 0,1 ml de la mezcla de reacción mediante el método de Bradford.

3.2.11. Sobreexpresión de las lipasas/esterasas candidatas en *E. coli* BIVU111

Todos los productos de la PCR 1 utilizados en el ensayo *in vitro* (Tabla 16), se clonaron en pBC SK(+), linearizado con *EcoRV* y se transformaron en *E. coli* BIVU111, que es una cepa de expresión derivada de la cepa de *E. coli* BL21, que expresa la RNA polimeraza T7 la cual es específica del promotor T7, el cual es inducible por salicilato (de Lorenzo y col., 1993b). En nuestro caso el promotor T7 se encontraba en el plásmido pBC SK(+).

Cada transformante se cultivó en medio TB o LB, incubándose a 37°C hasta una DO_{600nm} entre 0,7 y 1, y se separaron cultivos que se indujeron o no con 0,1 mM de salicilato, incubándose a 30°C durante 4 horas o a 20°C durante 20 horas. Para cada transformante y condición (T^a y concentración de salicilato usada para la inducción), se recogieron 25 ml de sobrenadante y células provenientes de 50 ml de cultivo inducido. Tanto a las fracciones intracelulares (total y soluble) como a la extracelular se le determinó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford y las actividades transesterificadora e hidrolítica.

3.2.12. Purificación de las lipasas/esterasas con actividad transesterificadora a partir de *Terribacillus* sp. AE2B 122

Las proteínas presentes en el sobrenadante de *Terribacillus* sp. AE2B 122 se separaron mediante dos tipos de cromatografías: cromatografía de interacción hidrofóbica y de exclusión molecular.

La cromatografía de interacción hidrofóbica (CIH) se basa en la unión reversible de las proteínas a ligandos hidrofóbicos inmovilizados (fase estacionaria). Durante la separación por CIH, los aminoácidos hidrofóbicos quedan expuestos y se unen a la matriz de la columna al usar un tampón con alta fuerza iónica. La elución se realiza utilizando un gradiente de disminución de la fuerza iónica del tampón (Queiroz y col., 2001).

En la cromatografía de exclusión molecular (a menudo también llamada filtración en gel o de tamiz molecular) las moléculas eluyen por orden decreciente de tamaño molecular (Duong-Ly & Gabelli, 2014; Hagel, 2011).

Cromatografía de interacción hidrofóbica (CIH)

Se partió de cultivos de 2 L de *Terribacillus* sp. AE2B 122 con una DO_{600} inicial de 0,01 en medio PYA + 1,5% NaCl, repartidos en dos matraces de 5 L para obtener un volumen ocupado del 20% y así mantener las condiciones óptimas de aireación. Estos cultivos se crecieron a 30°C y 200 rpm durante 72 h y se centrifugaron 1 h a 4000 rpm y 4°C en una centrifuga preparativa. Posteriormente el sobrenadante se recogió, se introdujo en una membrana de diálisis de 12 KDa (SIGMA) y se concentró con PEG 8 KDa (SIGMA) toda la noche a 4°C. El concentrado se dializó dividiéndolo en 2 vasos de 2 L de tampón fosfato potásico 0,05 M pH 7,6 con un 10% de sulfato de amonio (TPK+SA) durante 2 h. El dializado recuperado (35 ml) se filtró utilizando un filtro de membrana Millipore de 0,45 μ m en un sistema de filtración STERIFIL conectado a una bomba de vacío.

El volumen recuperado tras la filtración se pasó a través de una columna de CIH HiTrap Phenyl HP de 5ml (GE Healthcare). El procedimiento de purificación mediante FPLC (GE Akta Micro equipado con el software UNICORN) utilizado fue el siguiente:

1. Se lavó el sistema FPLC con H₂O MilliQ.

2. Se seleccionó la columna CIH HiTrap Phenyl HP, 5 ml.
3. Se hizo circular 25 ml de H₂O MilliQ a 3 ml/min.
4. Se equilibró la columna con:
 - 4.1. 25 ml de TPK seleccionando el canal B al 100% y el A al 0%, máximo 3 ml/min.
 - 4.2. 25 ml de TPK+SA seleccionando el canal A a 100%, y el B al 0%.
5. Se cargaron 10 ml de muestra y se inyectó en la columna. Este paso se repite tres veces (30 ml). Durante la inyección el flujo fue de 1,5 ml/min, posteriormente de 2 ml/min
6. Se lavó la columna con 25 ml de 100% TPK+SA
7. Por último se pasaron 80 ml de un gradiente de SA en tampón TPK. Se recogieron 4 ml en tubos de 10 ml, recogiéndose en total 20 fracciones del gradiente.
8. La columna se lavó con 25 ml de H₂O MilliQ y 25 ml de etanol al 20%.
9. En ninguno de los pasos se superó los 0,3 MPa.

Las fracciones recogidas se concentraron en PEG 8 KDa toda la noche a 4°C y se dializaron al día siguiente en TPK, concentrando las fracciones unas 6 veces. Del volumen recuperado tras dializar, se utilizaron 0,9 ml para medir la actividad transesterificadora y entre 50-100 µl para medir la concentración de proteínas.

Nota: en la purificación realizada para la obtención de las muestras utilizadas en los ensayos con MUF-Butirato, el flujo de inyección de la muestra (paso 5) se disminuyó hasta 0,7 ml/min y el paso 6 se modificó aumentando el volumen de 100% TPK+SA a 50 ml.

Cromatografía de exclusión molecular

La purificación utilizando cromatografía hidrofóbica se repitió varias veces para obtener suficiente cantidad de proteína para utilizar en el siguiente paso de purificación por tamaños de las proteínas. Se seleccionaron las zonas de mayor actividad transesterificadora de cada purificación. Las mismas zonas de cada repetición se unificaron y concentraron con PEG 8 KDa. Los concentrados se dializaron en TPK durante 1 h, concentrando finalmente las unificaciones hasta 10-13 veces. Cada unificación se dividió en tres y se sometió a cromatografía de exclusión molecular (CEM) utilizando una columna cromatográfica HiPrep 16/60 S-100 High Resolution (GE

Healthcare), mediante un sistema FPLC. Las muestras unificadas y el tampón (TPK) utilizados se filtraron con filtros de jeringa de 0,22 μm (Millipore). El procedimiento utilizado para la purificación fue el siguiente:

1. Se lavó el sistema FPLC con H_2O MilliQ.
2. Se seleccionó la columna CIH HiTrap Phenyl HP, 5 ml
3. Se equilibró la columna CIH HiTrap Phenyl HP con:
 - 3.1. 1 volumen de columna (VC = 120 ml) de H_2O MilliQ, a 0,5 ml/min.
 - 3.2. 2 VC de TPK a 1 ml/min.
4. Se cargaron 1,2-1,5 ml de muestra y se inyectaron en la columna.
5. Se pasaron por la columna 150-160 ml de TPK a un flujo que no superó los 0,22 MPa de presión. Se recogieron 25- 27 fracciones de 6 ml.
6. Por último se lavó la columna con 4 VC de H_2O destilada y 4 VC de etanol al 20%.

Cada fracción se utilizó para medir tanto la concentración de proteína mediante el método de Bradford, como la actividad transesterificadora, al igual que en el paso anterior de CIH. Los volúmenes de fracción utilizados para medir la concentración de proteínas fueron de 0,2 y 0,5 ml. Las fracciones en las que se detectó una mayor actividad, se analizaron en geles de acrilamida. Cada repetición de la purificación se separó en distintas zonas de actividad y se unificaron. Todas las fracciones unificadas se emplearon también para comprobar su capacidad para producir Biodiésel a escala de laboratorio.

3.2.13. Análisis de proteínas

3.2.13.1. Electroforesis desnaturizante de proteínas (SDS-PAGE)

La electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) se realizó siguiendo el método descrito por Laemmli (1970). Las muestras se desnaturizaron por calor en presencia de β -mercaptoetanol. La separación de las proteínas en función de su carga y de su masa molecular se llevó a cabo con el sistema de electroforesis vertical *Mini Protean Tetra Cell* (BioRad). En la Tabla 17, se detallan los componentes necesarios para la preparación de un gel SDS-PAGE y a continuación se describe el procedimiento a seguir para la preparación de un gel de poliacrilamida.

Tabla 17. Composición del gel de acrilamida

	Gel separador 10 %	Gel concentrador 4 %
Acrilamida 29:1	2,5 ml	0,5 ml
Tampón Tris HCl	2,5 ml Tris HCl 1M, pH 8,8 (Tampón de separación)	1,26 ml Tris HCl 0,5 M, pH 6,8 (Tampón de concentración)
SDS (10 %)	100 µl	50 µl
H₂O MilliQ	4,29 ml	3,18 ml
<i>Para polimerizar:</i>		
PSA	100 µl	25 µl
TEMED	10 µl	5 µl

1. En primer lugar se prepararon el gel separador: es importante tener en cuenta que los catalizadores de la polimerización, persulfato amónico (PSA) y tetrametiletenodiamida (TEMED), deben añadirse en último lugar.
2. Una vez mezclados los distintos componentes, la solución se aplicó en los cristales previamente montados, hasta alcanzar la altura deseada.
3. Se cubrió inmediatamente con 1 ml de 2-propanol para evitar el contacto con el aire y se deja polimerizar durante 30 minutos.
4. Una vez polimerizado el gel separador, se eliminó el 2-propanol con un papel de filtro. Se añadió 1 ml de Tris HCl 1,5 M pH 8,8 y se esperó 5-10 minutos para eliminarlo. Posteriormente se añade la mezcla del gel concentrador, se coloca el peine adecuado y se dejó polimerizar durante 15 minutos.
5. Se mezclaron X µl de muestra con X µl de solución Laemmli 4X, para una concentración final de solución Laemmli 1X, en un volumen final entre 20 y 60 µl. La mezcla se sometió a un tratamiento de desnaturalización a 90°C durante 5 minutos.
6. Una vez ensamblada la cubeta, se añadió el tampón de electroforesis y se cargaron las muestras en los pocillos junto al marcador de peso molecular.

7. Los electrodos se conectaron a una fuente continua y se mantuvo a 100-150 V. Una vez finalizada la electroforesis el gel se tiñó con una solución de azul Coomassie o con nitrato de plata.

Nota: Para el análisis en gel de la fracción intracelular insoluble, antes de mezclarlo con la solución Laemmli 4X, se resuspendió el precipitado insoluble en 10 mL de Tris-HCl 100 mM, pH 8,0 se centrifugó a 10000 x g y 4°C durante 15 minutos y se volvió a resuspender el nuevo precipitado en 10 mL de Tris-HCl 100 mM, pH 8,0 + 2% SDS.

- Solución Laemmli 4X: 240 mM Tris-HCl pH 6.8, 8% (p/v) de SDS, 20% glicerol, 0,02% p/v de azul de bromofenol y enrasar con H₂O destilada.
- Tampón de electroforesis (TAE) 10X: 30,2 g de Tris Base; 144 g de glicina; 10 g de SDS. Ajustar el volumen a 1 l con agua destilada. Ajustar pH a 8,6-8,8.
- Per-Sulfato Amónico (PSA): 10 % (p/v) en H₂O destilada.
- Tampón de separación (S): 51,36 g Tris Base, añadir H₂O destilada hasta 200 ml, ajustar el pH a 8,8 con HCl.
- Tampón de concentración (C): 17,12 g Tris Base, añadir H₂O destilada hasta 200 ml, ajustar el pH a 6,8 con HCl.

3.2.13.2. Tinción de proteínas en geles de acrilamida

Tinción con azul brillante de Coomassie

Una vez finalizada la electroforesis, los geles de acrilamida se tiñeron con una solución de azul brillante de Coomassie (Sigma) durante 1 hora y se destiñeron durante al menos 6 horas en una solución de desteñido. Todas las soluciones se conservaron a temperatura ambiente.

- Solución de azul brillante de Coomassie: azul de Coomassie (Brilliant blue) 0,1 % (p/v); metanol 45 % (p/v); ácido acético glacial 10 % (v/v).
- Solución de desteñido: metanol 40 % (v/v); ácido acético glacial 10 % (v/v).

Tinción con nitrato de plata

En aquellos casos en los que la concentración de proteínas era pequeña y se requería una mayor sensibilidad para poder visualizarlas, los geles de poliacrilamida se tiñeron utilizando nitrato de plata, dado que es entre 50 y 100 veces más sensible que la tinción con azul brillante de Coomassie (Schleicher & Watterson, 1983). Para la tinción con plata se utilizó el Kit SilverQuest™ Staining (INVITROGEN), siguiendo el protocolo descrito en el mismo.

Análisis del secretoma de *Terribacillus* sp. AE2B 122

Con el fin de estudiar las proteínas secretadas y compararlas con las lipasas/esterasas encontradas en el genoma, se crecieron células de *Terribacillus* sp. AE2B 122 en 25 ml de medio PYA + 1,5 % de NaCl, a 37 °C, 200 rpm, durante 72 h, partiendo de una DO_{600nm} de 0,01. Los 25 ml del cultivo se centrifugaron, separando el sobrenadante del precipitado. Este sobrenadante se colocó en una membrana de diálisis de 12 KDa (tubo de membrana de diálisis D9527-100FT, SIGMA ALDRICH) y se concentró durante una noche a 4°C con PEG (8 KDa, SIGMA), dializándolo posteriormente en tampón fosfato potásico 0,05 M (pH 7,6) con cuatro lavados de 30 minutos a 4°C. Una parte del volumen recuperado tras la diálisis se cargó en un gel de acrilamida y se dejó correr la muestra aproximadamente unos 10 minutos a 80 V (desde que la muestra entra en el gel separador), lo que corresponde a unos 10-12 mm en el gel. Posteriormente, el gel se tiñó durante 15 minutos con azul brillante de Coomassie recién preparado y se sometió a 3-4 lavados de 15 minutos en solución de desteñido, 2-3 lavados con H₂O MilliQ y finalmente se dejó en H₂O MilliQ toda la noche a 4°C. El gel se escaneó y el carril se seccionó en 3-4 bandas, estas bandas se lavaron por separado, 2 veces con H₂O MilliQ, en tubos de 1,5 ml, el agua se eliminó y finalmente, cada tubo se secó en un centrífuga de vacío. Los fragmentos secos del gel se enviaron al servicio de proteómica INIBIC CH Universitario de A Coruña para su análisis por huella peptídica, con el fin de determinar las proteínas secretadas.



3. CAPÍTULO 1

3.3. RESULTADOS



3.3. RESULTADOS

3.3.1. Selección y caracterización de microorganismos productores de Biodiésel

Para la selección de organismos productores de Biodiésel se tuvo en cuenta no solo el método a seguir, sino también la elección de la zona de muestreo donde se esperaba encontrar organismos adaptados al crecimiento en ambientes lipídicos, como puede ser una almazara.

Con respecto al método de selección utilizado se decidió seguir un sistema de tres pasos en el que se van descartando progresivamente cepas. En el primer paso se seleccionaron solo organismos lipolíticos con capacidad de hidrolizar tributirina. Los organismos lipolíticos seleccionados se sometieron a un segundo filtro más restrictivo en el que se seleccionaron por su capacidad para transesterificar el *p*-nitrofenol palmitato (*p*NP). Los extractos de las cepas capaces de transesterificar el *p*NP, con alta eficiencia, se sometieron a un análisis mediante cromatografía de gases para analizar los productos de la transesterificación de aceite de girasol.

Finalmente, las mejores cepas que resultaron de este tercer análisis, se caracterizaron filogenéticamente mediante la secuenciación y el análisis del ARNr 16S, y bioquímicamente mediante el análisis en placa de distintas actividades enzimáticas (amilasa, proteasa, ADNasa, pululanasa y xilanasa).

3.3.1.1. Zona de muestreo y análisis

Uno de los objetivos principales de este trabajo era obtener nuevos microorganismos capaces de producir Biodiésel a partir de aceites vegetales. Por eso, se seleccionaron zonas de muestreo ricas en aceites vegetales, en concreto cuatro zonas distintas de una almazara en Écija (Sevilla, España) a finales del mes de Enero de 2011. Las muestras se denominaron según la zona de la almazara donde se recogieron, denominando como balsa 1 (AE1B) y balsa 2 (AE2B) las muestras de balsas que contenían residuos líquidos de la almazara. La muestra de alpechín (AEA) se recogió de los residuos sólidos de la almazara y la última muestra, llamada “deshidratado de hojas” (AEDH), se obtuvo de residuos sólidos de la cosecha de aceitunas que contenían principalmente los restos de hojas y ramas.

Las características químicas y fisicoquímicas de las muestras recolectadas se muestran en la Tabla 18. El análisis de las muestras reveló que el elemento metálico más abundante en todas las muestras fue el Fe, aunque en la muestra AEDH se encontraron sólo diferencias mínimas entre el contenido de Fe, Mn, Cu y Zn. El resto de los elementos analizados fueron C > Ca > N > K > S > Mg > Na > P (del más al menos abundante). Las excepciones fueron la muestra AE2B donde no se detectó S, la muestra AEA donde el P fue más abundante que el Na y el N más abundante que el Ca, y la AEDH donde el Mg era más abundante que el S. El pH de todas las muestras estaba alrededor de 6,5, menos en la muestra de alpechín (AEA), la cual mostró un pH de 4,7. En la mayoría de las muestras la materia orgánica representaba el 30-40%, excepto en la muestra AEA, que fue la más rica en composición de materia orgánica (95,8%).

Tabla 18. Análisis químicos y físicos químicos de las muestras de la almazara

Parámetros	Muestras ^a			
	AE1B	AE2B	AEA	AEDH
C total (%)	16,24	22,490	66,410	22,970
N total (%)	0,894	0,616	1,169	0,819
S Total (%)	0,05594	N.D ^d	0,100	0,052
K (%)	0,144	0,110	0,456	0,269
Na (mg/Kg)	61,234	130,597	168,019	235,668
Mg (%)	0,018	0,030	0,022	0,059
Ca (%)	1,602	1,500	0,074	1,861
P (mg/Kg)	36,755	43,541	280,390	168,848
Mn (mg/Kg)	63,528	95,033	12,015	125,528
Fe (mg/Kg)	599,663	651,608	139,812	151,260
Cu (mg/Kg)	73,277	49,632	27,195	140,325
Zn (mg/Kg)	19,163	14,253	29,750	11,955
pH (1/5)	6,84	6,55	4,68	6,27
C.E. 1/5 (mS/cm)^b	1,68	2,62	3,89	2,14
Humedad (%)	5,460	4,690	5,819	5,179
M.O. (%)^c	30,709	40,186	95,801	40,782
CaCO₃ total (%)	9,499	8,808	1,262	6,314

^a Todos los resultados se representan en relación a la masa seca de las muestras

^b C.E.: Conductividad Eléctrica

^c M.O.: Materia Orgánica

^d N.D.: No Detectado

3.3.1.2. Primer paso de la selección: aislamiento de microorganismos con actividad lipolítica (hidrólisis)

Como primer paso en el proceso de selección, se ensayó la actividad hidrolítica de los microorganismos de las distintas muestras tomadas en la almazara. Se utilizó un ensayo fácil y rápido, basado en la inspección visual de microorganismos formadores de halo de degradación alrededor de las colonias, en placas que contienen el sustrato lipídico tributirina, tal y como se describe en Material y Métodos.

Para la separación de los microorganismos de las partículas de materia orgánica, un gramo de muestra de suelo se resuspendió en 3 ml de solución salina estéril (CINa 0,85% p/v). Se aumentó el volumen de la suspensión con la misma solución salina (CINa 0,85% p/v) hasta obtener un volumen de 25 ml. Para obtener colonias aisladas se sembraron distintas diluciones de la suspensión en medio sólido de LB, PDB, Agar-agua, K9 A, K9 G o K9 Gamp, suplementado con 0,5% de tributirina.

Durante esta primera ronda de selección, 1.016 colonias (hongos, levaduras y bacterias) se identificaron como productoras de halo de hidrólisis (Tabla 19). La muestra AEA fue la que mostró el menor número de bacterias lipolíticas aisladas y AE2B la que mostró mayor número. La mayoría de los microorganismos se obtuvieron en los medios K9 A, K9 G y K9 Gamp (68% de los hongos, 65% de las bacterias y 65% de las levaduras totales). Se decidió estudiar sólo las bacterias ya que a primera vista mostraron mayor diversidad fenotípica y por tanto, se seleccionaron las 291 bacterias lipolíticas aisladas para el posterior paso de selección.

Tabla 19. Distribución de los microorganismos lipolíticos aislados de las muestras de la almazara

Muestra	Total	Bacterias	Levaduras	Hongos
AE1B	256	61	21	174
AE2B	392	166	208	10
AEDH	248	57	190	1
AEA	128	7	70	51
Total	1.016	291	489	236

3.3.1.3. Segundo paso de selección: Análisis de la actividad transesterificadora en las bacterias lipolíticas aisladas

Para este segundo paso de selección, se empleó un método basado en la transesterificación del *p*-nitrofenolpalmitato (*p*-NPP) con etanol para liberar el compuesto *p*-nitrofenol (*p*-NP) tal y como se ha descrito en Materiales y Métodos.

Con el fin de seleccionar solo enzimas extracelulares, este segundo paso del proceso de selección se desarrolló usando únicamente el sobrenadante de las bacterias seleccionadas en el primer paso del método de selección y descartando las células. La selección se llevó a cabo cultivando cada bacteria lipolítica en 5 ml de LB, durante toda la noche. Estos cultivos se utilizaron para inocular tubos, con 5 ml de LB adicionado con un 2% de tributirina, a una DO_{600nm} final de 0,1, que se incubaron durante 3 días a 30 °C y 200 rpm. Posteriormente, el cultivo resultante se centrifugó, separando así las células del sobrenadante. Se tomaron 1,8 ml del sobrenadante y se liofilizaron. El sobrenadante liofilizado se utilizó en el ensayo de transesterificación, y se midió su absorbancia a 410 nm tras 16 h de reacción.

Durante el proceso de selección se llevaron a cabo dos tipos distintos de reacciones control, una en ausencia de etanol y otra sin sobrenadante de las bacterias. El *p*-NP liberado bajo estas reacciones control se considera el resultado de una reacción de hidrólisis (en ausencia de etanol) o de una reacción no enzimática (en ausencia de sobrenadante). Los resultados de estos controles de hidrólisis se usaron como punto de

corte para determinar la existencia de actividad transesterificadora. El valor máximo de absorbancia a 410 nm obtenido en las reacciones de control de hidrólisis fue de 0,8. La reacción de transesterificación con todas las cepas lipolíticas seleccionadas en el primer paso del método, se llevó a cabo en paralelo. Todas las cepas bacterianas que mostraron valores de absorbancia por encima del punto de corte de DO_{600nm} 0,8 se consideraron positivas, y los valores por debajo de este punto de corte se consideraron negativos (Tabla 20). Según los criterios descritos, 58 cepas se consideraron positivas, de estas, las 30 mejores, las cuales mostraron valores de absorbancias ≥ 1 , fueron seleccionadas para posteriores análisis y cuantificación de la producción de Biodiésel a escala de laboratorio.

Tabla 20. Clasificación y selección de bacterias mostrando actividad transesterificadora

Absorbancia 410 nm	Número de cepas	Positivo/Negativo
> 1	30	Positivo
1 – 0.8	28	Positivo
< 0.8	233	Negativo

3.3.1.4. Tercer paso del método de selección: Selección de sobrenadantes bacterianos capaces de producir Biodiésel a escala de laboratorio

El objetivo de este tercer paso fue identificar el mejor sobrenadante bacteriano en la producción de Biodiésel a escala de laboratorio. Para optimizar el protocolo de selección, primero se cultivaron las 30 bacterias seleccionadas, según lo indicado en materiales y métodos. En un primer intento los sobrenadantes no fueron procesados (ver Materiales y Métodos, apartado 3.2.9.1) y se liofilizaron directamente para obtener un polvo fino y seco que pudiera ser usado directamente para la producción de Biodiésel. La reacción de transesterificación para la producción de Biodiésel se llevó a cabo a pH básico con aceite de girasol, etanol y el sobrenadante liofilizado. Tras la finalización de la reacción, la mezcla de Biodiésel/lípido/ácido graso se analizó por CG. Los cromatogramas mostraron claras diferencias entre los tiempos de retención de los productos finales (FAEE + MG), iniciales (TG) e intermedios (DG) (Figura 13).

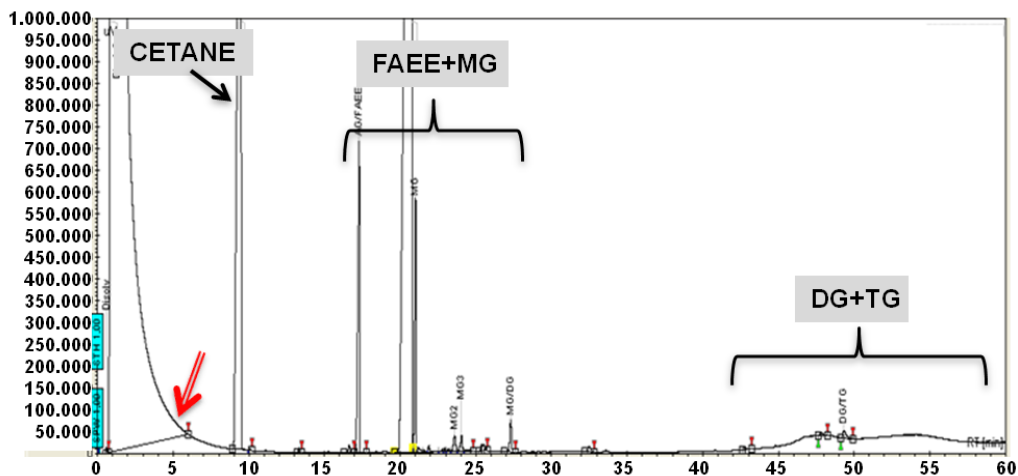


Figura 13. Cromatograma obtenido por CG de la mezcla de reacción tras la transesterificación del aceite de girasol y el etanol utilizando el sobrenadante procesado de la cepa AE2B 122. El cetano se usó como patrón interno. FAEE: Éster etílico de ácido graso; MG: Monoglicérido; DG: Diglicérido; TG: Triglicérido. La flecha de doble línea señala el tiempo de retención esperado para el glicerol (Luna y col., 2013; Verdugo y col., 2010)

A diferencia del cromatograma de la mezcla de reacción tras la transesterificación de aceite de girasol y etanol utilizando el sobrenadante procesado de la cepa AE2B 122 (Figura 13), el cromatograma del aceite de girasol sin transesterificar (Figura 14) no contiene ninguna señal integrada, sólo muestra un acúmulo de picos a tiempos de retención elevados.

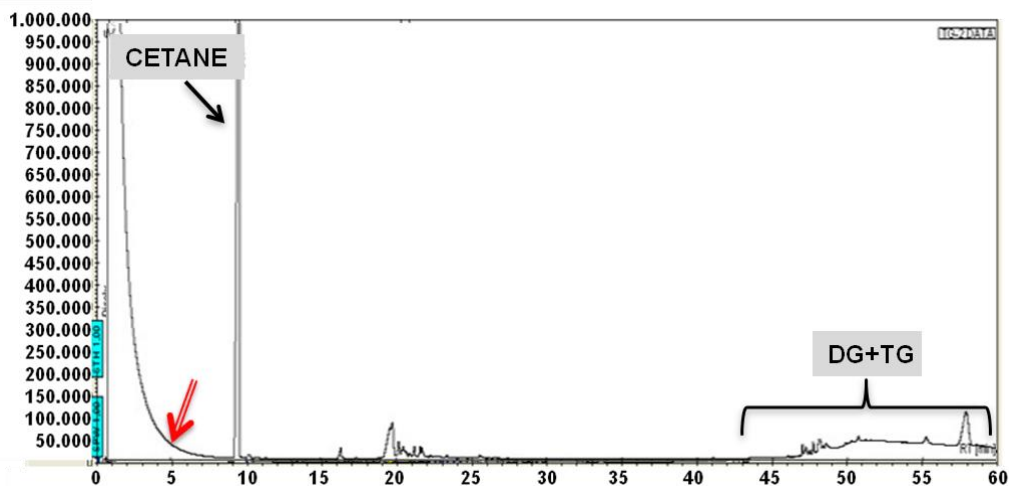


Figura 14. Cromatograma obtenido por CG del aceite de girasol. El cetano se usó como patrón interno. DG: Diglicérido; TG: Triglicérido. La flecha de doble línea señala el tiempo de retención esperado para el glicerol (Luna y col., 2013; Verdugo y col., 2010)

El rendimiento de producción obtenido con este tipo de sobrenadante (no procesado) fue en todos los casos, menor del 22% (Figura 15). Por eso, para intentar mejorar el rendimiento de la producción de Biodiésel, los sobrenadantes de los cultivos fueron procesados (concentrados y dializados), tal y como se explica en Materiales y Métodos. Tras este procesamiento, se liofilizaron y utilizaron para los ensayos de producción de Biodiésel, observando que aumentaba drásticamente la producción (hasta 17,8 veces) en comparación con las muestras no procesadas alcanzando rendimientos cercanos al 100% (Figura 15).

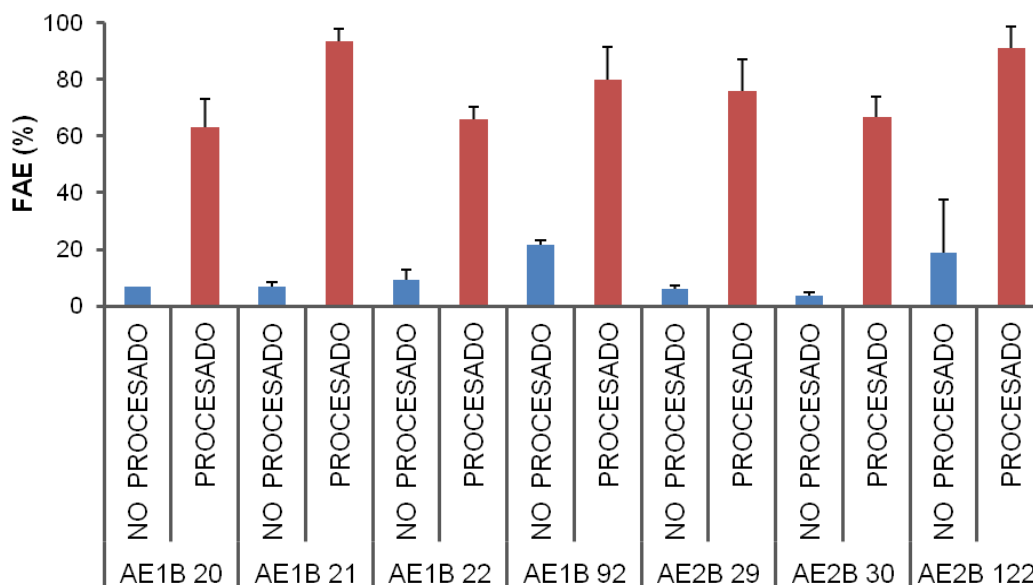


Figura 15. Comparación de la producción de Biodiésel usando sobrenadante procesado y no procesado. Los sobrenadantes bacterianos se procesaron tal y como se describe en Materiales y Métodos. Ambos tipos de sobrenadantes (procesado y no procesado) fueron liofilizados y empleados en la reacción de transesterificación con aceite de girasol y etanol. Los resultados se muestran como porcentajes de FAE (FAEE + MG) producidos tras 24 h de reacción, usando 7 bacterias lipolíticas elegidas al azar. Los datos son la media de al menos 2 experimentos independientes

Por tanto, descubrimos que con un proceso fácil y barato de concentración y diálisis se podía incrementar el rendimiento de la producción de Biodiésel. Una vez que este protocolo estuvo optimizado, se procedió a cuantificar la producción de Biodiésel en las 30 cepas bacterianas optimizadas y seleccionadas en el paso anterior. Los resultados completos de la reacción usando sobrenadantes procesados se muestran en la Tabla 21. Ya que la composición del Biodiésel es una mezcla de FAEEs y la composición del Biofuel que integran glicerol en forma de monoglicéridos es una mezcla de FAEs, el valor más importante a ser considerado es el porcentaje de FAE (FAEE + MG), el cual es una mezcla de 2 moles de FAEE y un mol de MG.

Una vez analizados los datos, se observó que 5 de los sobrenadantes bacterianos fueron capaces de producir más de un 80% de FAEs, otros 10 sobrenadantes bacterianos produjeron entre 60-80% de FAEs, y la producción de los 15 restantes estaba por debajo del 60% de FAEs.

Nueve de los extractos bacterianos fueron capaces de convertir más del 80% de los TG en la mezcla de reacción (conversión de los TG a DG + FAE).

Tabla 21. Análisis por CG de la reacción de transesterificación del aceite de girasol por los sobrenadantes bacterianos

Muestra	FAE %^a	DG %	TG %	Conversión %
Aceite de girasol	3,4	29,9	66,7	33,3
Control negativo	13,8	41,9	44,3	55,7
AE1B 20	63,1	6,7	30,2	69,8
AE1B 21	93,7	6,3	0,0	100
AE1B 22	65,9	2,5	31,7	68,4
AE1B 26	80,1	12,9	7,1	92,9
AE1B 27	57,9	4,3	37,7	62,3
AE1B 28	58,7	3,1	38,2	61,8
AE1B 35	67,4	2,5	30,2	69,8
AE1B 89	72,2	11,6	16,2	83,8
AE1B 90	58,6	2,7	38,7	61,3
AE1B 92	80,1	7,5	12,4	87,6
AE2B 29	76,0	7,8	16,2	83,8
AE2B 30	66,8	5,1	28,1	71,9
AE2B 85	41,2	13,8	45,1	54,9
AE2B 120	35,1	15,1	50,1	50,2
AE2B 122^b	91,16	1,75	6,8	93,2
AE2B 130	71,8	8,1	20,1	79,9
AE2B 131	61,27	9,55	14,59	85,41
AE2B 133	34,8	19,5	45,7	54,3
AE2B 134	31,7	2,1	66,3	33,7
AE2B 199	25,0	3,3	71,7	28,3
AE2B 222	77,5	3,2	12,9	87,1
AE2B 232	48,1	0,7	51,2	48,8
AE2B 250	46,4	10,7	42,9	57,1
AE2B 259	30,7	8,3	61,0	39,0
AE2B 261	82,6	7,8	9,6	90,4
AE2B 263	49,3	10,5	40,2	59,8
AE2B 264	24,1	2,6	73,3	26,7
AE2B 332	54,0	0,7	45,4	54,7
AE2B 340	51,4	1,0	47,6	52,4
AEDH 145	61,0	4,0	35,0	65,0

^a El porcentaje de FAE muestra el rendimiento en la producción de Biodiésel en la mezcla de reacción. La conversión muestra el porcentaje de triglicéridos (TG) metabolizados durante la reacción.

^bEl sobrenadante de esta cepa crecida en en sus condiciones óptimas de crecimiento (apartado 3.3.2.2) produjo un 99,9% de FAE y un 100% de conversión.

Durante este proceso de selección de la mejor cepa productora de Biodiésel, se observó que el glicerol no aparecía en el tiempo de retención esperado (5 min). Esto sugiere que los TGs se convirtieron en ésteres etílicos (FAEEs) y MG, bajo nuestras condiciones experimentales (Figura 13). Esto se había observado previamente en reacciones de transesterificación llevadas a cabo por la lipasa pancreática porcina (Luna y col., 2013).

A nivel industrial es importante considerar tanto los tiempos de reacción como la posible reutilización de los sobrenadantes enzimáticos, con el objeto de abaratar costes de producción y de materias primas, respectivamente. Por este motivo, se realizaron ensayos de cinética de la producción de Biodiésel y de la reutilización de los sobrenadantes de tres de las 30 bacterias lipolíticas al azar. Los estudios de cinética se llevaron a cabo con sobrenadantes procesados recogiendo muestras a los tiempos indicados hasta 24 h para analizar la composición química de la mezcla de reacción. La Figura 16 muestra un ejemplo representativo de un experimento de cinética realizado con la cepa AE1B 92. Después de una hora de reacción, el sobrenadante bacteriano fue capaz de producir el 90% de FAE. Se observaron variaciones muy leves en la composición de la reacción a lo largo de las 24 h de la reacción. Se encontraron resultados similares con las otras dos cepas bacterianas (resultados omitidos).

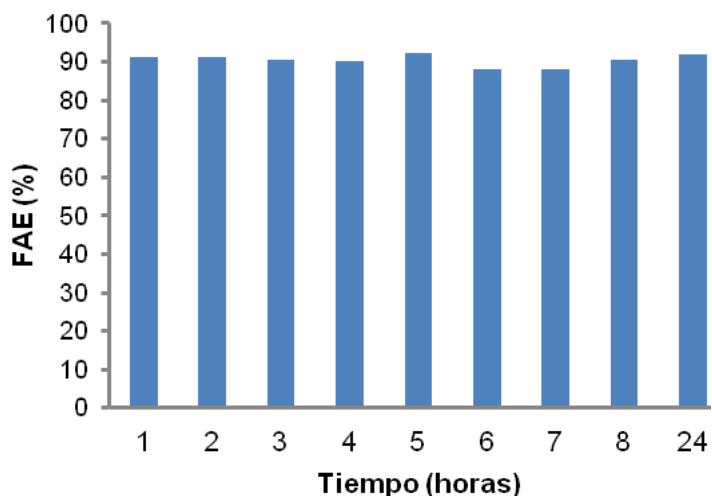


Figura 16. Estudio de la cinética de la producción de Biodiésel con la cepa bacteriana AE1B 92. La reacción de transesterificación se llevo a cabo con sobrenadante procesado y las muestras se recogieron y analizaron por CG a los tiempos indicados

Un aspecto económico a ser considerado durante el proceso industrial es el número de veces que un sobrenadante puede ser empleado durante la producción de Biodiésel. Por tanto, se seleccionaron al azar 5 cepas bacterianas para estudiar el número de veces que sus sobrenadantes pueden ser reutilizados. En todos los casos los sobrenadantes se pudieron utilizar al menos 5 veces sin perder significativamente su actividad. En la Figura 17 se muestra un experimento de reutilización del sobrenadante de la cepa AE1B 92.

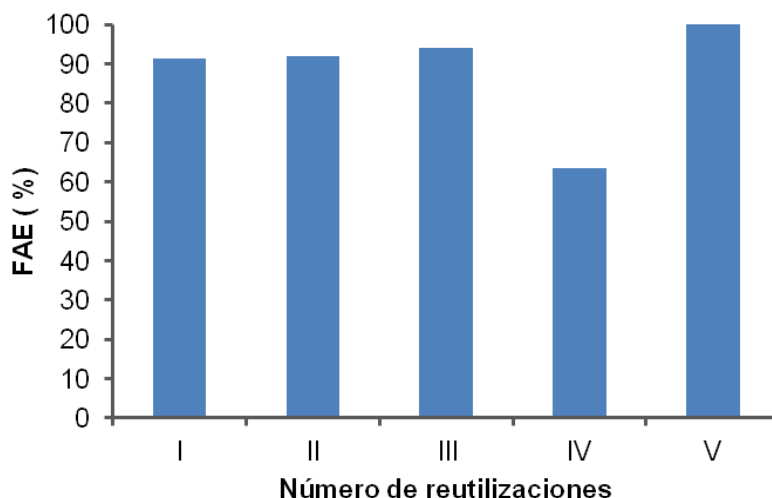


Figura 17. Análisis de CG de las reutilizaciones del sobrenadante de la cepa AE1B 92 en la producción de Biodiésel. La reacción de transesterificación se llevo a cabo con sobrenadante procesado. Tras la finalización de la reacción, la mezcla se centrifugó, el Biodiésel se analizó por CG y el pellet se utilizó para otra reacción de transesterificación. La reacción se repitió 5 veces

3.3.1.5. Medidas de la viscosidad

La alta similitud de los valores de retención cromatográficos obtenidos entre los diferentes MG y FAEE de la mezcla de reacción, sugería que las propiedades reológicas de estos componentes eran similares, bajo nuestras condiciones de ensayo. La viscosidad es un factor importante a tener en cuenta para futuras aplicaciones de este Biodiésel en motores Diésel. Por tanto, se midió la viscosidad del Biodiésel derivado de la reacción mediante los extractos bacterianos seleccionados, utilizando el sobrenadante procesado y sin procesar.

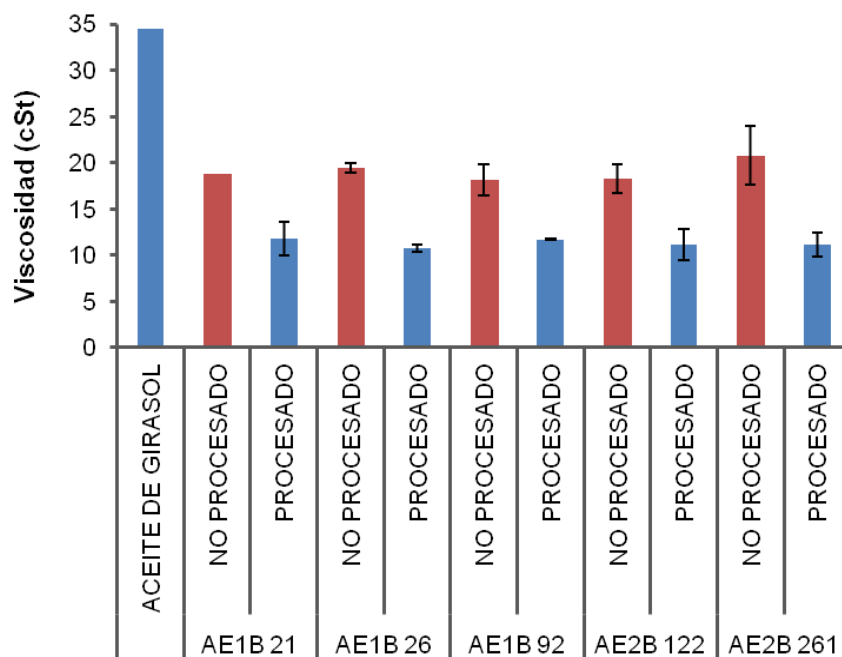


Figura 18. Análisis de la viscosidad de los productos de reacción en la producción de Biodiésel con el sobrenadante (procesado y no procesado) de las 5 mejores cepas

Todos los sobrenadantes seleccionados para la producción de Biodiésel redujeron la viscosidad de los productos de la mezcla de reacción, al menos 3 veces comparado con la viscosidad del aceite de girasol (Figura 18). El procesamiento de los sobrenadantes, redujo aún más la viscosidad de los productos de la reacción, aportando otra evidencia de lo ventajoso que resulta el uso de sobrenadantes procesados.

3.3.1.6. Análisis filogenético de las bacterias productoras de Biodiésel

Con el fin de asignar cada una de las 30 bacterias productoras de Biodiésel a un grupo filogenético específico, se amplificó por PCR el ARNr 16S de cada bacteria utilizando los cebadores universales 16F27 y 16R1488 (Tabla 12). Se determinaron aproximadamente 650 pb de las secuencias de los fragmentos de ADN amplificados (Ver Materiales y Métodos) y se alinearon utilizando el software disponible en el *Ribosomal Database Project* (RBD). Posteriormente se realizaron reconstrucciones filogenéticas con varios métodos y todas tuvieron resultados consistentes, por eso solo se muestra el árbol obtenido mediante el método *Neighbor-Joining*, que utiliza el algoritmo de *Maximum Composite Likelihood* para calcular las distancias evolutivas (Figuras 19 y 20).

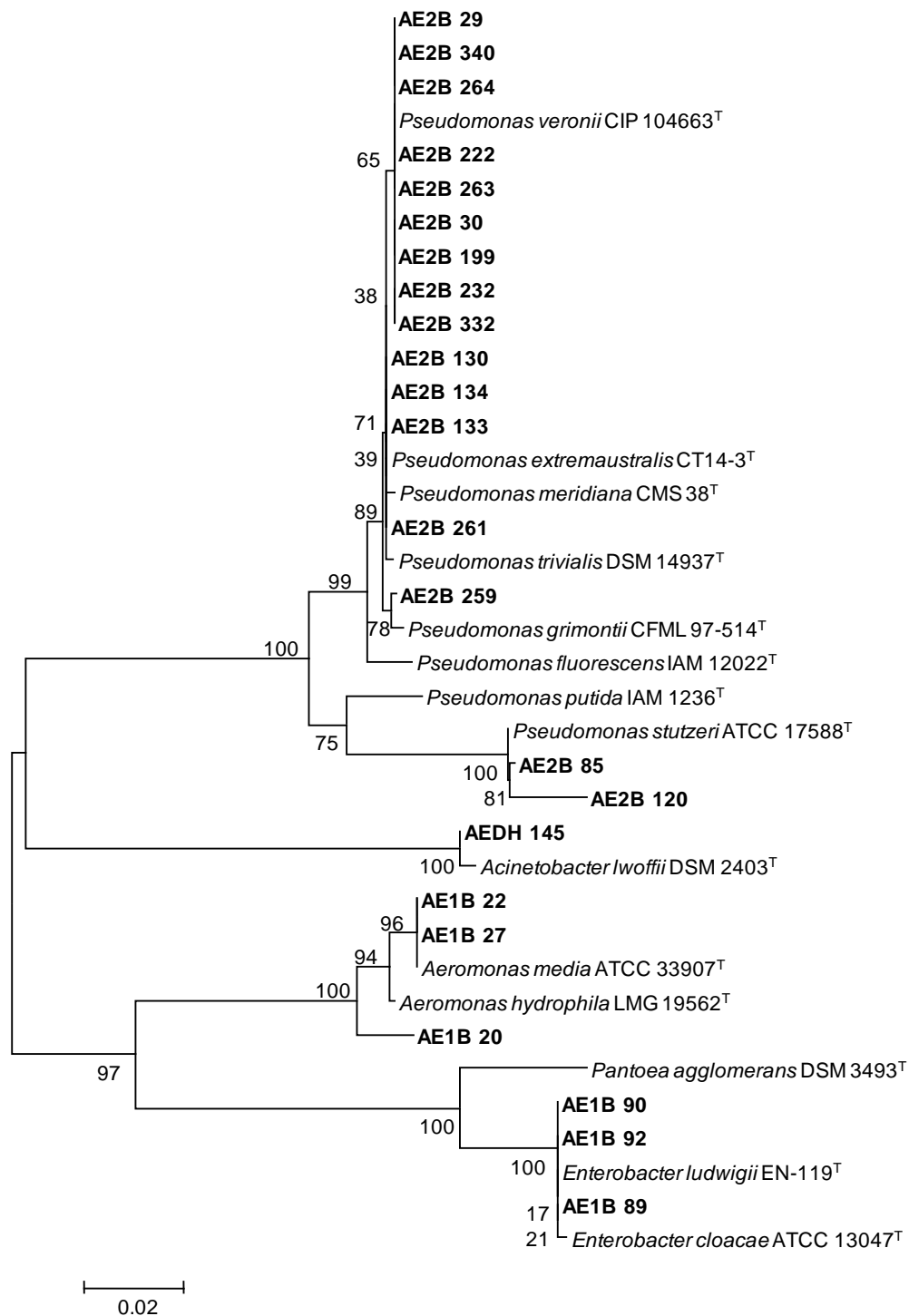


Figura 19. Árbol filogenético que muestra las relaciones filogenéticas entre las cepas Gram negativas seleccionadas. Las bacterias aisladas en este trabajo se marcan en negrita. La barra representa una distancia de un 2% de diferencia entre secuencias

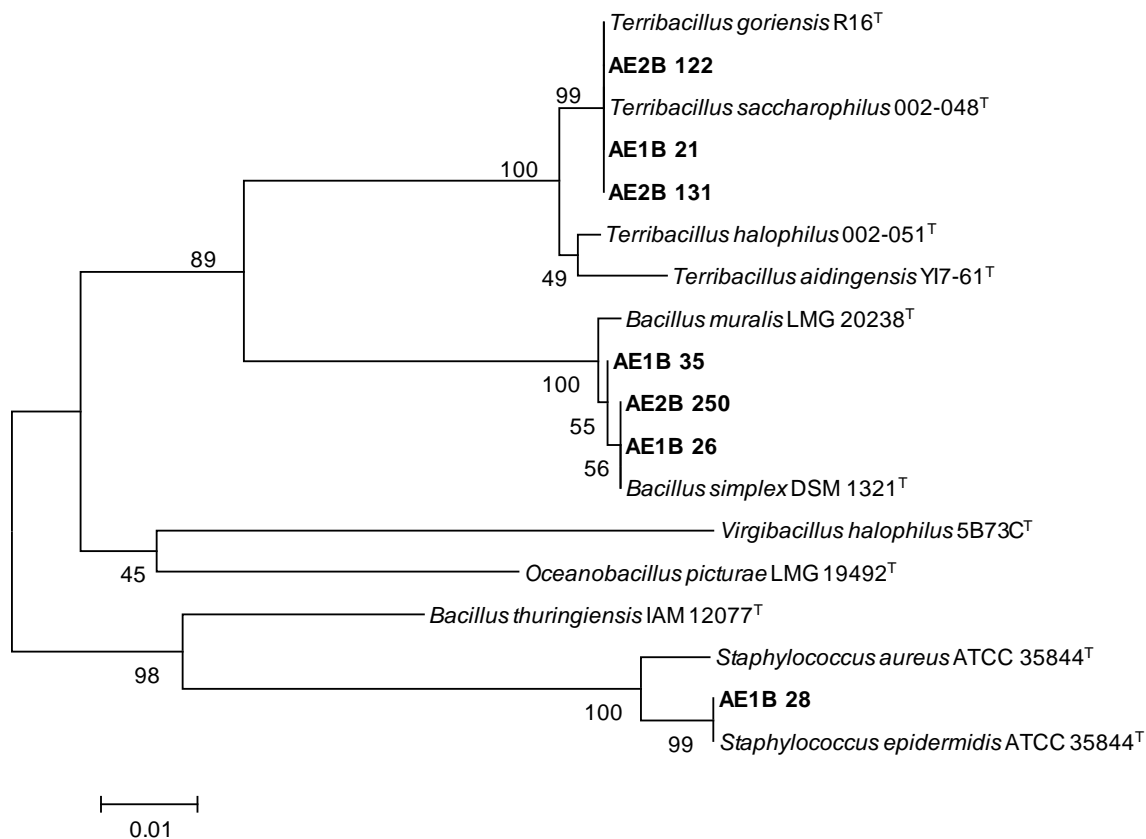


Figura 20. Árbol filogenético que muestra las relaciones filogenéticas entre las cepas Gram positivas seleccionadas. Las bacterias aisladas en este trabajo se marcan en negrita. La barra representa una distancia de un 1% de diferencia entre secuencias

El análisis filogenético mostró una gran diversidad, incluyendo tanto representantes de bacterias Gram positivas como Gram negativas. La Tabla 22 muestra la cepa más cercana filogenéticamente a cada cepa aislada, según los resultados obtenidos de los análisis filogenéticos.

Tabla 22. Análisis filogenéticos de las cepas seleccionadas

Muestra	Cepa filogenéticamente relacionada	Número de acceso	% Similitud
AE2B 29	<i>Pseudomonas veronii</i>	AF064460	99-100
AE2B 30			
AE2B 199			
AE2B 222			
AE2B 232			
AE2B 263			
AE2B 264			
AE2B 332			
AE2B 340			
AE2B 130	<i>Pseudomonas extremaustralis</i>	AJ583501	99-100
AE2B 133			
AE2B 134			
AE2B 261			
AE2B 259	<i>Pseudomonas grimontii</i> CFML	AF268029	99
AE2B 85	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	AF094748	98-100
AE2B 120			
AEDH 145	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	X81665	99
AE1B 89	<i>Enterobacter ludwigii</i>	AJ853891	99-100
AE1B 90			
AE1B 92			
AE1B 20	<i>Aeromonas hydrophila</i>	AJ508765	99
AE1B 22	<i>Aeromonas media</i>	X60410	99-100
AE1B 27			
AE1B 26	<i>Bacillus simplex</i>	AJ439078	99-100
AE2B 250			
AE1B 35	<i>Bacillus muralis</i>	AJ316309	99
AE1B 28	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	D83363	99
AE1B 21	<i>Terribacillus goriensis</i> ^a	DQ519571	99-100
AE2B 122	<i>T. saccharophilus</i> ^a	AB243845	
AE2B 131			

^aLas cepas AE1B 21, AE2B 122 y AE2B 131 mostraron el mismo % de similitud con ambos, *T. goriensis* y *T. saccharophilus*

La mayoría de estas cepas lipolíticas se obtuvieron de la muestra AE2B, obtenida de la balsa 2 (19 cepas): 16 de ellas pertenecen al género *Pseudomonas*, 2 de ellos al género *Terribacillus* y una cepa al género *Bacillus*. Diez de las cepas lipolíticas se obtuvieron de la muestra AE1B (balsa 1) y pertenecen a los géneros *Enterobacter* (3 cepas), *Aeromonas* (3 cepas), *Bacillus* (2 cepas), *Staphylococcus* (1 cepa) y *Terribacillus* (1 cepa).

Solo una cepa se obtuvo de la muestra AEDH (deshidratado de hojas) y pertenece al género *Acinetobacter*. Un dato interesante es que no se seleccionaron cepas lipolíticas de la muestra AEA, obtenida del alpechín (Tabla 22).

3.3.1.7. Caracterización de las actividades hidrolíticas de las bacterias productoras de Biodiésel

Para caracterizar las bacterias productoras de Biodiésel que se habían seleccionado, se analizó la actividad hidrolítica de estas 30 cepas. Para ello se sembraron en placas del medio adecuado conteniendo el correspondiente sustrato.

Las actividades amilasa y ADNasa fueron las actividades hidrolítica más abundantes encontrada entre las bacterias aisladas (11 cepas). Ocho cepas mostraron actividad proteasa y 5 presentaron actividad pululanasa. Sin embargo, ninguna de ellas mostró actividad xilanasas (Tabla 23). Tres de las cepas (*Aeromonas* sp. AE1B 27, *Aeromonas* sp. AE1B 22 y *Aeromonas* sp. AE1B 20) mostraron todas las actividades hidrolíticas ensayadas (excepto xilanasas). Por el contrario, 12 de las cepas no mostraron ninguna actividad hidrolítica bajo nuestras condiciones de ensayo, lo que supone un 40% de los aislamientos.

Tabla 23. Actividades hidrolíticas de las 30 cepas bacterianas productoras de Biodiésel

Muestra	ADNasa	Pululanasa	Xilanasa	Amilasa	Proteasa
AE2B 29	-	-	-	-	+
AE2B 30	-	-	-	-	+
AE2B 199	+	-	-	+	-
AE2B 222	+	-	-	+	-
AE2B 232	+	-	-	+	-
AE2B 263	-	-	-	-	+
AE2B 264	-	-	-	-	+
AE2B 332	+	-	-	+	-
AE2B 340	+	-	-	+	-
AE2B 130	-	-	-	-	-
AE2B 133	-	-	-	-	-
AE2B 134	-	-	-	-	-
AE2B 261	-	-	-	-	-
AE2B 259	-	-	-	-	-
AE2B 85	-	+	-	+	-
AE2B 120	-	+	-	+	-
AEDH 145	-	-	-	-	-
AE1B 89	-	-	-	-	-
AE1B 90	-	-	-	-	-
AE1B 92	-	-	-	-	-
AE1B 20	+	+	-	+	+
AE1B 22	+	+	-	+	+
AE1B 27	+	+	-	+	+
AE1B 26	+	-	-	-	-
AE2B 250	+	-	-	-	-
AE1B 35	+	-	-	-	+
AE1B 28	-	-	-	+	-
AE1B 21	-	-	-	-	-
AE2B 122	-	-	-	-	-
AE2B 131	-	-	-	-	-

3.3.2. Estrategias para la identificación y aislamiento de los genes y proteínas responsables de la actividad transesterificadora de *Terribacillus* sp. AE2B 122

Las cepas relacionadas con el género *Terribacillus* (AE2B 122 y AE1B 21), fueron las que proporcionaron mejores resultados en la producción de Biodiésel. Por tanto, se decidió continuar con una de ellas, en concreto *Terribacillus* sp. AE2B 122, para realizar un estudio más extenso. En primer lugar se trató de identificar el gen responsable de la actividad transesterificadora del sobrenadante de esta cepa, siguiendo las siguientes estrategias:

Estrategia 1. Secuenciación y análisis bioinformático del genoma.

Estrategia 2. Análisis del secretoma.

Estrategia 3. PCR a tiempo real (RT) de las lipasas candidatas.

Estrategia 4. Ensayos de producción *in vitro* de las lipasas candidatas y comprobación de su actividad transesterificadora.

Estrategia 5. Sobreexpresión de las lipasas candidatas en *E. coli* BIVU111.

Estrategia 6. Purificación a partir del propio organismo de la proteína responsable.

3.3.2.1. Estrategia 1. Secuenciación y análisis bioinformático del genoma de *Terribacillus* sp. AE2B 122

La secuenciación y ensamblaje del genoma de la cepa *Terribacillus* sp. AE2B 122, se realizó por la empresa BGI-HongKong Co., Ltd. Se utilizó una tecnología de secuenciación Illumina de alto rendimiento para llevar a cabo la secuenciación de extremos emparejados de las muestras de ADN.

En la Tabla 24 se muestra tanto la distribución del porcentaje de bases como la calidad de la secuencia a lo largo de las lecturas tras la filtración de los datos crudos de secuenciación.

Tabla 24. Datos de secuenciación y filtración de datos

Nombre de muestra	Tamaño de inserto (pbs)	Datos brutos (Mb)	^a Conectores (%)	^b Duplicación (%)	^c Datos limpios (Mb)
ADN AE2B 122	474	509	0,009	0,357	452

^a Porcentaje de los conectores eliminados en los datos brutos

^b Porcentaje de la duplicación eliminada en los datos brutos

^c Tamaño de los datos limpios

Los análisis del ensamblaje de la secuencia se realizaron usando el programa SOAP*de novo*, versión 1.05. El valor del parámetro clave K utilizado, para un resultado óptimo de ensamblaje, fue de 63. Tras la optimización del ensamblaje mediante el emparejamiento de extremos y las relaciones de solapamiento para construir contigs y supercontigs, se obtuvo el ensamblaje final de la secuencia con un total de 91 contigs, 22 supercontigs y un tamaño de 3.718.326 pbs (Tabla 25).

Tabla 25. Resultados del ensamblaje tras la optimización

	Supercontig	Contig
Número total	22	91
Tamaño total (pbs)	3.725.516	3.718.326
N50 (pbs)	497.293	94.030
N90 (pbs)	134.116	29.455
Máxima longitud (pbs)	1.047.776	252.059
Mínima longitud (pbs)	529	200
%GC de la secuencia	42,88	42,88

Nota: la primera columna es la estadística de supercontig ≥ 500 pbs. La segunda columna es la estadística de los contigs obtenidos al romper los supercontig (≥ 500 pbs) de la primera columna con N

El genoma se anotó utilizando el servidor RAST, el cual realiza anotaciones rápidas utilizando tecnología de subsistemas. Los datos estadísticos de esta anotación se muestran en la Tabla 26 y en la Figura 21.

Tabla 26. Datos estadísticos del genoma de *Terribacillus* sp. AE2B 122 con el servidor RAST

Taxonomía Bacteria; <i>Firmicutes</i>; <i>Bacilli</i>; <i>Bacillales</i>; <i>Bacillaceae</i>; <i>Terribacillus</i> sp	
Tamaño	3.718.326 bases
Número de contigs*	91
Contenido GC (%)*	42,9
Tamaño del contig mas corto*	200 bases
Tamaño del contig mediano	17.961 bases
Tamaño medio de los contigs	40.860,7 bases
Tamaño del contig mas largo*	252.059 bases
ORFs	3.769
ARNs	42
Tamaño medio de ORF	863,24 bases

*Estos datos coinciden con los de la Tabla 25 obtenidos con SOAP*de novo*

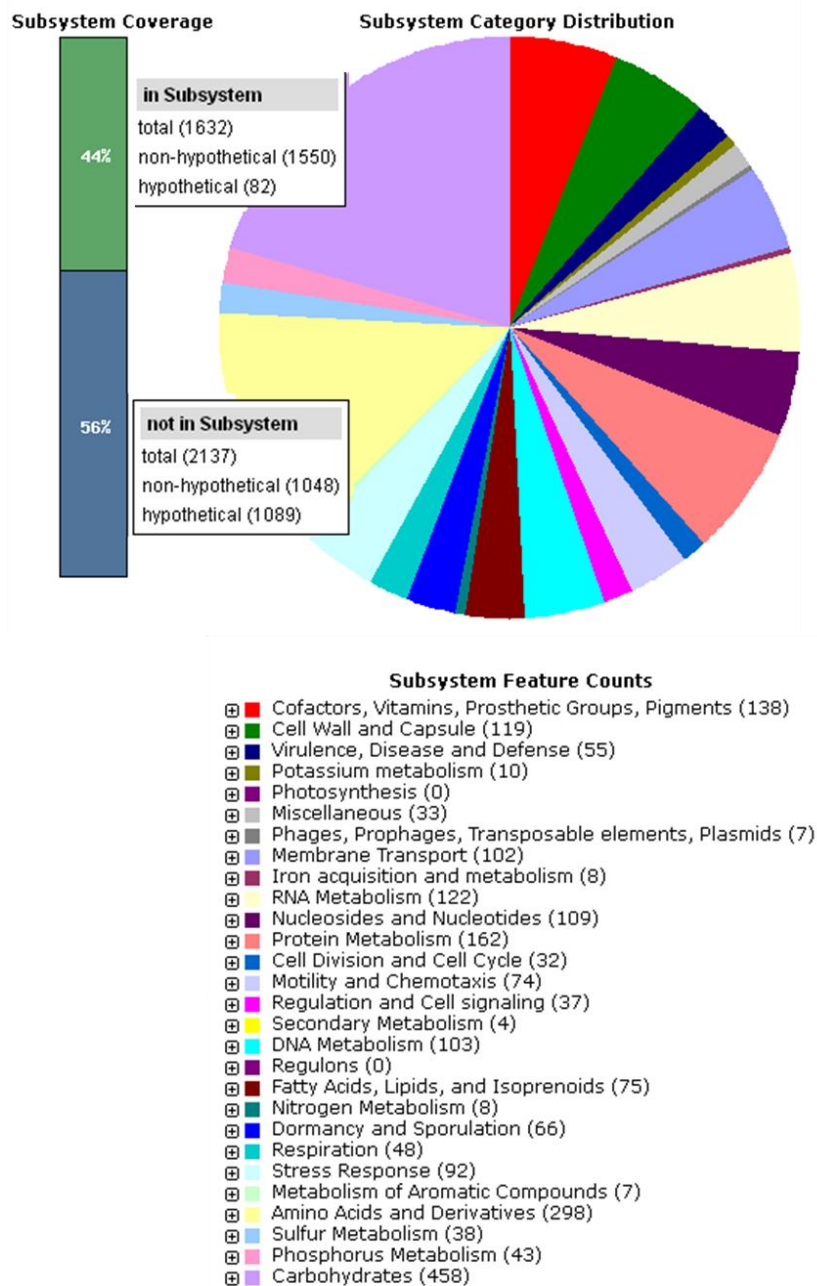


Figura 21. Distribución de los genes del genoma de *Terribacillus* sp. AE2B 122 en las categorías de subsistemas, utilizando el servidor RAST

Tal y como se observa en la Figura 21, de los 3.769 ORFs anotados en el genoma de *Terribacillus* sp. AE2B 122, 1.632 se encontraban en subsistemas. La categoría de subsistemas que más genes abarcó (458 genes de 1.632) fue la del metabolismo de carbohidratos, y la que menos (4 genes de 1.632) fue la del metabolismo secundario.

También se identificaron homólogos de 7 genes en la categoría de fagos, profagos, transposones y plásmidos. Se identificaron 75 genes para el metabolismo de ácidos grasos, lípidos e isoprenoides. De estos genes, 8 se determinaron como posibles lipasas/esterasas candidatas responsables de la actividad transesterificadora.

Para realizar unos análisis más detallados de las 8 lipasas candidatas se utilizaron herramientas bioinformáticas tanto del NCBI como de EXPASY: BLASTP; InterProScan; lipoP; signal P; PSORTb versión 3.0.2; y MyHits. Para la búsqueda de dominios y familias se utilizó Blastp, InterProScan y MyHits. Para determinar si las proteínas eran extracelulares o no se utilizaron los programas PSORTb, LipoP y signal P.

A continuación se muestran en la Tabla 27 un resumen de los resultados más relevantes obtenidos del análisis bioinformático.

Tabla 27. Análisis bioinformático de las lipasas/esterasas candidatas

Proteína	BlastP/ InterProScan/ MyHits		Péptido señal y localización celular		
	Superfamilias	Multi-dominios	Lipo P*	Signal P*	PSORTb
Tel1	Familia fosfolipasas parecidas a la patatina (PLPs)	<ul style="list-style-type: none"> • acilesterasa/fosfolipasa RssA • Dominio Acil transferasa/Acil hidrolasa/lisofosfolipasa 	No	No	Membrana citoplasmática
Tel2	Familia II de lipasas** bacterianas (hidrolasa SGNH,GDSL)	<ul style="list-style-type: none"> • SGNH, GDSL 	No	No	Citoplasmática
Tel3	Familia esterasa/lipasa Familia IV de lipasas**	<ul style="list-style-type: none"> • α/β-hidrolasa 3 • Acetil esterasa-lipasa Aes 	No	No	Citoplasmática
Tel4	Familia esterasa/lipasa Familia IV de lipasas**	<ul style="list-style-type: none"> • α/β-hidrolasa 3 • Acetil esterasa-lipasa Aes 	Si	No	Membrana citoplasmática
Tel5	Familia II de lipasas** bacterianas (hidrolasa SGNH,GDSL)	<ul style="list-style-type: none"> • SGNH, GDSL 	Si	Si	Sin localización
Tel6	Familia esterasa/lipasa	<ul style="list-style-type: none"> • α/β-hidrolasa 5 	No	No	Sin localización
Tel7	Familia esterasa/lipasa Familia I.4 de lipasas**	<ul style="list-style-type: none"> • Triacylglycerol esterasa-lipasa EstA • α/β-hidrolasa 6 	Si	Si	Extracelular
Tel 8	Familia esterasa/lipasa	<ul style="list-style-type: none"> • α/β-hidrolasa 3 • Acetil esterasa-lipasa Aes 	No	No	Citoplasmática

*Predicción de presencia de péptido señal

**Según alineamiento con el software Clustal Omega y filogenia con el software MEGA4

3.3.2.2. Estrategia 2: Análisis del secretoma de *Terribacillus* sp. AE2B 122

Una vez elucidada la secuencia del genoma nos planteamos un abordaje proteómico para identificar las proteínas secretadas, asumiendo que al menos una de ellas debería ser una lipasa/esterasa. En primer lugar se realizó la optimización de las condiciones de crecimiento de la cepa, para detectar aquellas condiciones que daban lugar a una mayor actividad transesterificadora, lo que nos serviría en el resto de estrategias de identificación del gen responsable de la actividad transesterificadora. Para esto se creció *Terribacillus* sp. AE2B 122 en distintos medios: PYA + 1,5% NaCl (PYA); PYA + 1,5% NaCl + 2% tributirina (PYAT); LB; y LB+2% tributirina (LBT), a 30°C y 200 rpm. Se recogieron la fracciones intracelular y extracelular para realizar las medidas de actividad transesterificadora (Figura 22) a distintas horas (4, 7, 24, 48 y 72) y se analizó también la DO_{600 nm} para controlar el crecimiento (Figura 23).

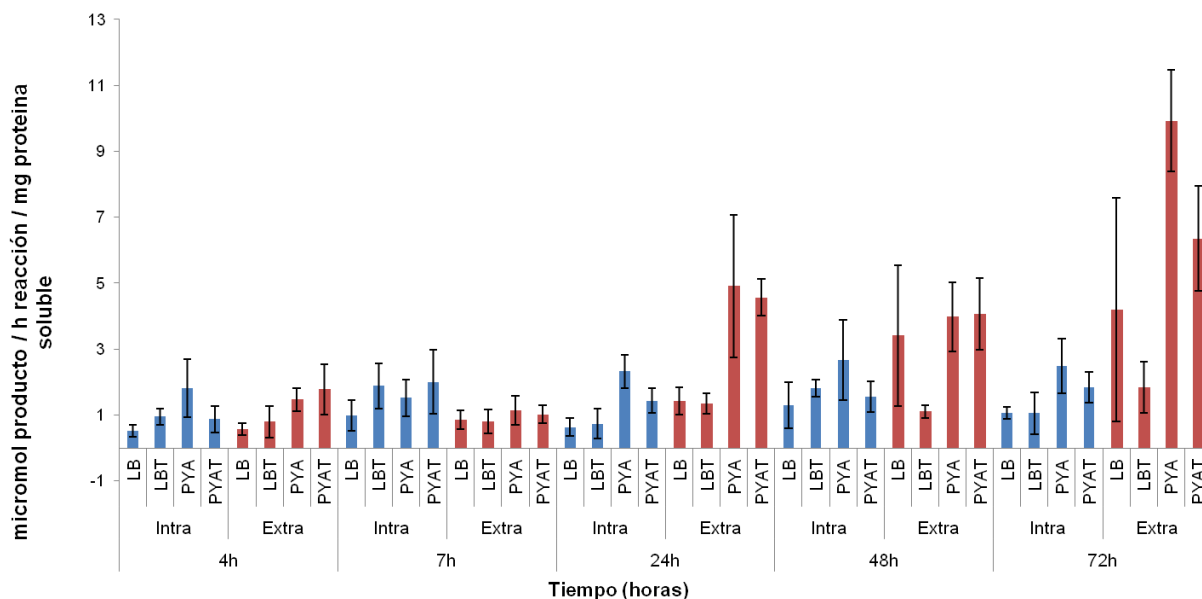


Figura 22. Valores de la actividad transesterificadora específica de proteínas soluble en la mezcla de reacción del sobrenadante y de la fracción intracelular de *Terribacillus* sp. AE2B 122 a distintos tiempos. Se muestra el valor medio de 4 experimentos independientes. Intra: fracción intracelular; Extra: fracción extracelular

Como se aprecia en los resultados de la actividad transesterificadora (Figura 22), la mayor actividad transesterificadora se detecta a las 72 h de crecimiento en PYA, utilizando la fracción extracelular. Hay que destacar también el hecho de que los resultados de actividad extracelular en medio LB, desde la 48 h hasta las 72 h, presentan un error significativamente alto. Se pudo constatar una lisis celular a partir de las 24 h de crecimiento en medio LB, la cual permanecía incluso usando quelantes de Ca y Mg como el EDTA y EGTA, por lo que es posible que la lisis se deba a un proceso de *quorum sensing* y no a la presencia de fagos. Esta lisis celular que se detecta puede ser la responsable de los errores de la curva de crecimiento en medio LB, tras 24 h (Figura 23), ya que la recuperación del crecimiento tras el lisado en medio LB, al contrario que en LBT, es muy variable. Así, solo en medio LB se aprecia estos errores tan significativos en el crecimiento de la cepa y en la actividad transesterificadora.

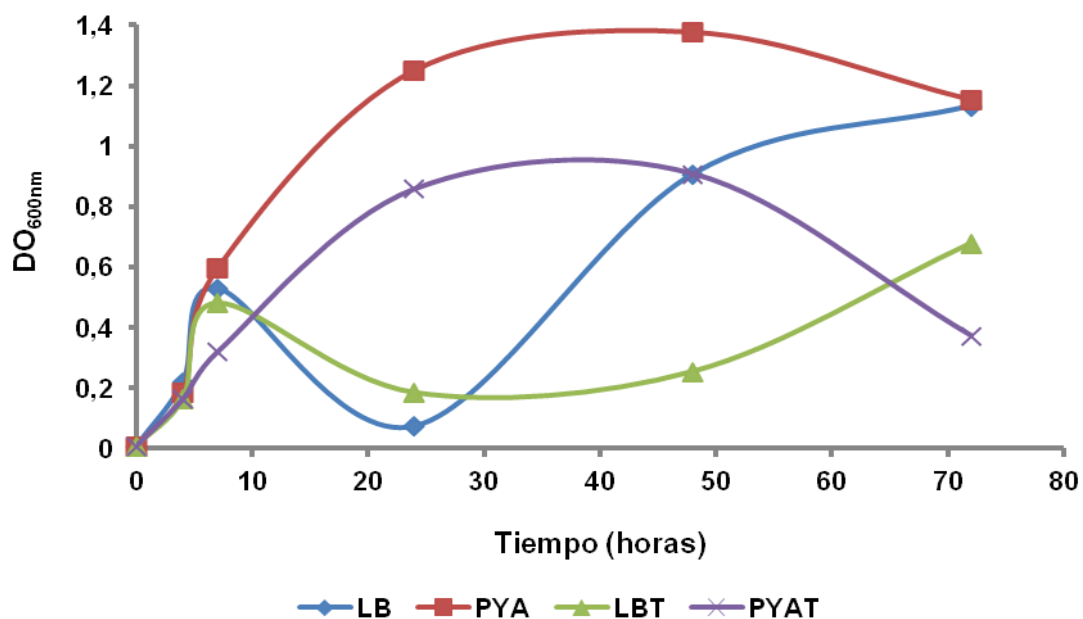


Figura 23. Curva de crecimiento de *Terribacillus* sp. AE2B 122 en distintos medios de cultivo

El crecimiento de la cepa en medio PYA muestra los mejores resultados, llegando a las 48 h a la máxima DO_{600nm} (1,4). El crecimiento en el medio PYAT se encuentra retrasado, comparado con el crecimiento en PYA, y en ningún caso la estirpe logra alcanzar la misma DO que en el medio sin tributirina (Figura 23).

El crecimiento en los medios LB y LBT es similar hasta las 24 h, cuando se puede producir la lisis celular, a partir de ese momento la recuperación del crecimiento es variable entre ambos medios, y al igual que ocurre en PYA no se llega a alcanzar la misma DO en el medio con tributirina que en el medio sin tributirina (Figura 23).

Las condiciones óptimas de crecimiento y actividad transesterificadora seleccionadas fueron: cultivo en medio PYA + 1,5% NaCl durante 72 h a 30°C y 200 rpm.

A continuación, se procedió al estudio del secretoma. El análisis se realizó identificando mediante huella peptídica las proteínas de la fracción extracelular de *Terribacillus* sp. AE2B 122 concentrada (PEG 8 KDa) y dializada (TPK 0,05 M). La cepa se creció según las condiciones óptimas que se determinaron en el ensayo de optimización.

Se pudieron identificar un total de 398 proteínas por huella peptídica utilizando MALDI-TOFF. Este número parecía muy elevado (un 11% del número total de genes descritos). Además, muchas de las proteínas detectadas eran supuestamente intracelulares (como por ejemplo, proteínas ribosomales, factores de elongación de la traducción, proteínas del metabolismo de ARN...etc), mientras que muchas otras eran proteínas de membrana, como los transportadores de tipo ABC. Esto puede deberse al fenómeno de lisis celular, aunque visualmente solo se producía en LB. Sin embargo, los datos obtenidos mediante el análisis proteómico del secretoma sugieren que esta lisis también se produce en PYA, aunque probablemente en menor grado. De todas las proteínas identificadas en el secretoma, ninguna correspondía a una lipasa/esterasa o tenía algún dominio que sugiriera una posible actividad transesterificadora. Las posibles explicaciones son porque o bien no son responsables de la actividad ensayada y no aparecían en las condiciones seleccionadas, o bien porque su concentración es minoritaria comparada con el resto de proteínas, de tal modo que quedaban enmascaradas y no se detectaban.

3.3.2.3. Estrategia 3. Análisis de la expresión de las 8 lipasas/esterasas candidatas por RT-qPCR

Con el propósito de identificar cual o cuales de las lipasas candidata/s eran las responsables de la actividad transesterificadora, se procedió a comprobar si el patrón de expresión de alguno de los genes candidatos coincidía con el patrón de actividad transesterificadora detectada en el sobrenadante de *Terribacillus* sp. AE2B 122.

El primer paso de la RT-qPCR fue diseñar los cebadores para las lipasas/esterasas candidatas y para los genes constitutivos de referencia (subunidad A de la girasa, *gyrA* y subunidad β de la ARN pol bacteriana, *rpoB*). Los genes de referencia (*gyrA* y *rpoB*) se escogieron como controles para normalizar los datos de expresión de las lipasas. Estos genes se utilizaron como control interno de la reacción debido a que han mostrado una expresión constitutiva y estable en otros microorganismos pertenecientes a los géneros *Streptococcus* y *Listeria* (Graham y col., 2002; Smoot y col., 2001; Sue y col., 2004).

Teniendo en cuenta los datos obtenidos en la optimización de las condiciones de crecimiento de la cepa expuestas en el análisis del secretoma, se obtuvo el ARN de *Terribacillus* sp. AE2B 122, extraído de cultivos crecidos a distintos tiempos (7, 24, 48 y 72 h) en medio PYA + 1,5% NaCl, a 30°C y 200 rpm.

Con respecto a la elección del gen de referencia, se seleccionó *gyrA* debido a que su expresión era más constante que la de *rpoB*, manteniéndose en valores similares en las distintas condiciones. Esto se comprueba analizando las curvas de replicación de los distintos genes en las distintas condiciones, si se observa solapamiento, se asume que la expresión es independiente de las condiciones (Figuras 24 y 25).

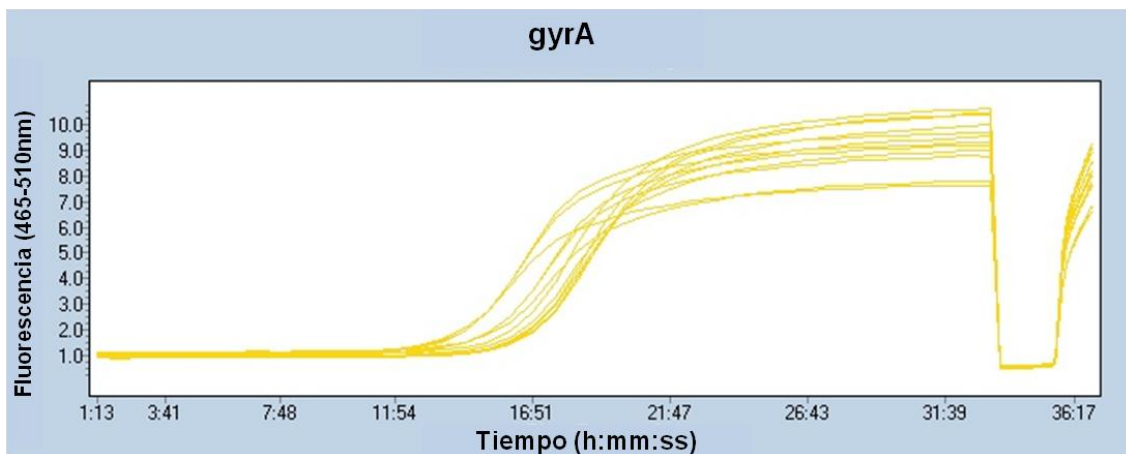


Figura 24. Curvas de replicación en la RT-Q-PCR de *gyrA* en las distintas condiciones estudiadas

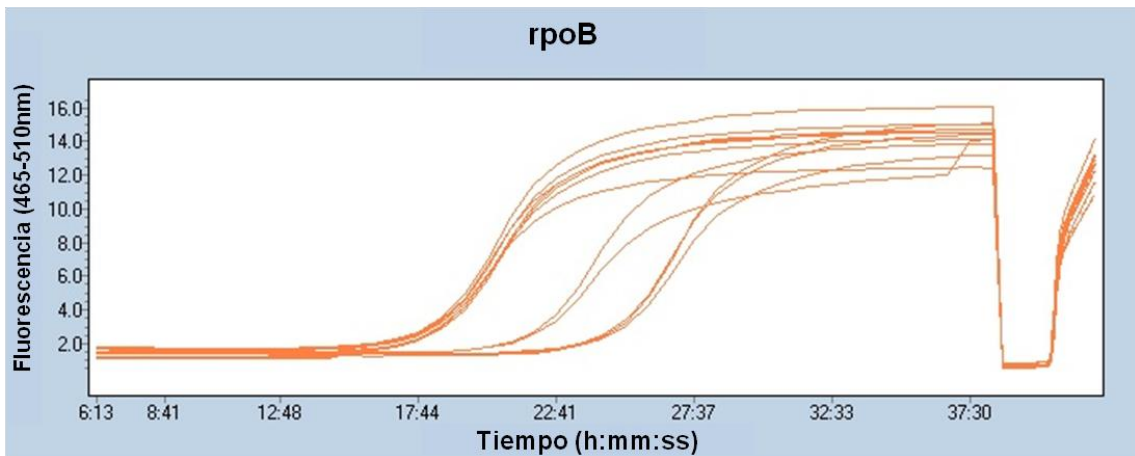


Figura 25. Curvas de replicación en la RT-Q-PCR de *rpoB* en las distintas condiciones estudiadas

Los resultados de la expresión de cada gen de las lipasas/esterasas (*tel1- tel8*) se refirieron a la expresión del gen *gyrA* en las mismas condiciones de crecimiento (Figura 26).

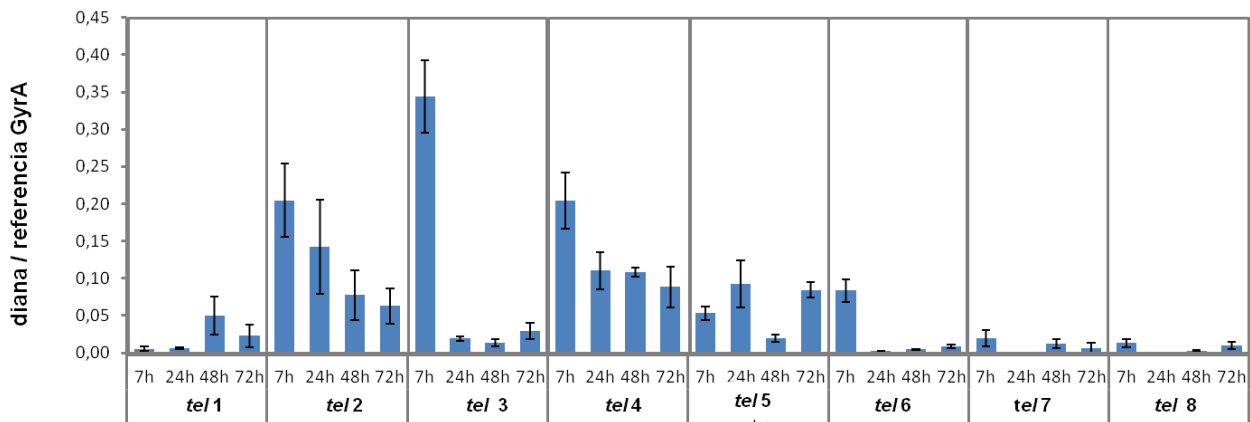


Figura 26. Expresión mediante RT-Q-PCR de los genes candidatos (*tel1-tel8*) a distintos tiempos

El gen que mayor expresión presentó fue *tel3*, que al igual que *tel2*, *tel4*, y *tel6* mostraron su mayor expresión a las 7 h. Ninguno de los genes se expresó siguiendo el patrón de actividad mostrado por el sobrenadante de *Terribacillus* sp. AE2B, donde se determinó que la mayor actividad transesterificadora se detectaba a las 72 h, aumentando a partir de las 24 h.

3.3.2.4. Estrategia 4. Producción *in vitro* de las lipasas candidatas y comprobación de su actividad transesterificadora

Las 8 enzimas candidatas se sintetizaron *in vitro* para comprobar su actividad transesterificadora y ver si alguna de ellas era la responsable de la actividad de interés detectada en el sobrenadante de *Terribacillus* sp. AE2B 122. Para ello, primero se sintetizó por PCR un fragmento de ADN con cada uno de los genes candidatos bajo el control del promotor del fago T7. Después, se sintetizaron las proteínas con el kit *ExiProgen*TM EC1 Protein Synthesis, que permite la transcripción y traducción *in vitro*. De la solución de proteína sintetizada de cada gen, se utilizaron distintas cantidades para el ensayo de transesterificación (0,5 ml liofilizado) y para el de hidrólisis (0,1 ml). Se calculó la actividad transesterificadora de cada producto, tanto la actividad transesterificadora específica y total de proteína soluble (Figura 27) como la actividad hidrolítica específica de proteínas soluble (Figura 28).

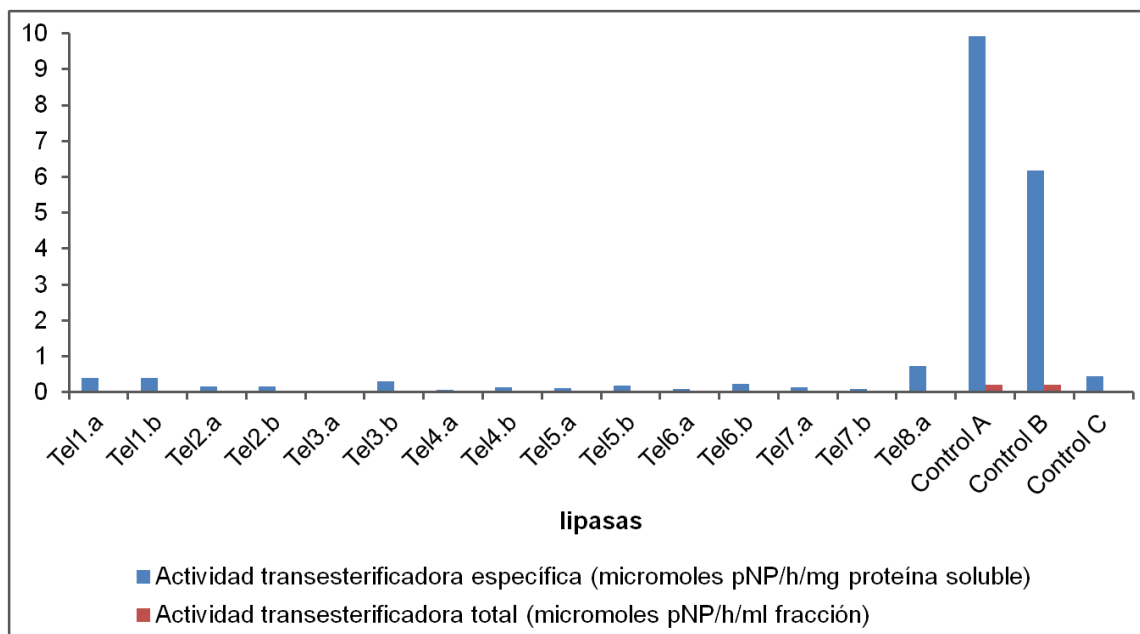


Figura 27. Actividad transesterificadora específica (μ moles *p*NP/h/mg proteína) y total (μ moles *p*NP/h/ml fracción utilizada) de las proteínas sintetizadas *in vitro* por duplicado (a y b), comparadas con la actividad detectada en el sobrenadante de *Terribacillus* sp. AE2B 122. Control A: sobrenadante de *Terribacillus* sp. AE2B 122 crecido en 25 ml de PYA + 1,5% NaCl, 72 h a 30°C y 200 rpm. Control B: sobrenadante de *Terribacillus* sp. AE2B 122 crecido en 2 L de PYA + 1,5% NaCl, 72 h a 30°C y 200 rpm. Control C: proteína control Cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) suministrada por el kit *ExiProgen*TM EC1 Protein Synthesis

Como se aprecia en la Figura 27, la actividad transesterificadora, específica y total, de las proteínas candidatas, en ningún caso es igual o superior a la actividad del sobrenadante de *Terribacillus* sp. AE2B 122. De hecho, la mayoría de las actividades son iguales o inferiores a la de la proteína control, la cual no debería tener actividad transesterificadora ni lipolítica (hidrolítica) ya que se trata de CAT. Los niveles de expresión *in vitro* de las proteínas fueron bajos, lo que puede significar que estos niveles de expresión fueron insuficientes para detectar la actividad deseada, por lo que los resultados no fueron concluyentes.

Al realizar los ensayos para determinar la actividad hidrolítica (Figura 28), los resultados obtenidos fueron similares a los de la actividad transesterificadora, de forma que todas las proteínas presentaron una actividad igual o inferior a la proteína control CAT.

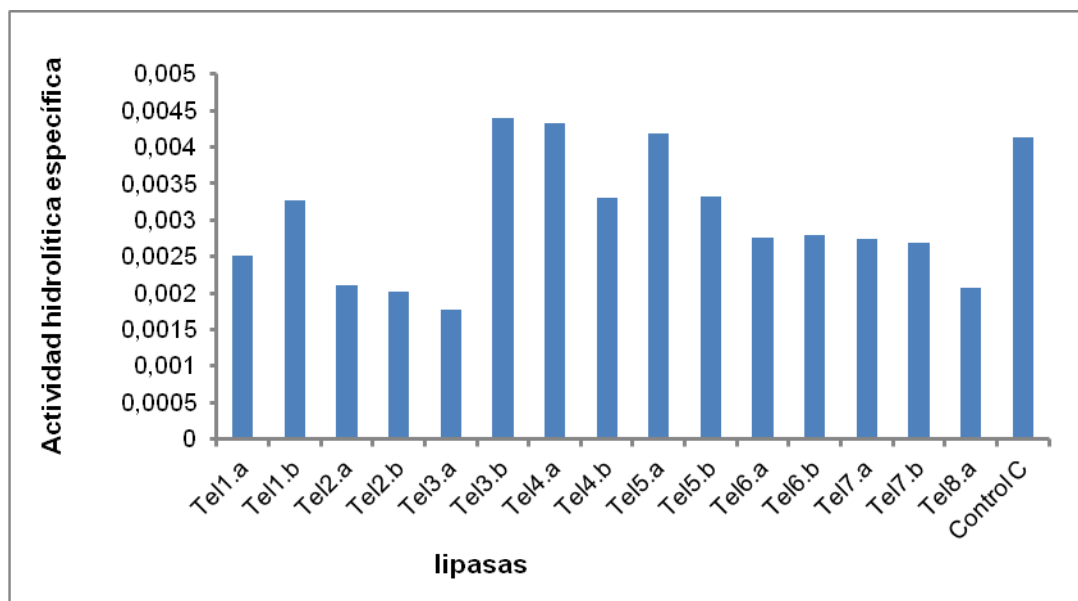


Figura 28. Actividad hidrolítica específica (μ moles pNP/h/mg proteína) de las proteínas sintetizadas *in vitro*. Ensayos realizados por duplicado (a y b) Control C: proteína control Cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) suministrada por el kit *ExiProgen*TM EC1 Protein Synthesis

3.3.2.5. Estrategia 5. Sobreexpresión de las lipasas candidatas de *Terribacillus* sp. AE2B 122 en *E. coli* BIVU111

Tras los ensayos de actividad de las enzimas sintetizadas *in vitro* no se pudo determinar si alguna de las proteínas candidatas del genoma de *Terribacillus* sp. AE2B 122 era la responsable de la actividad transesterificadora del sobrenadante de este organismo, por este motivo se procedió a diseñar una estrategia consistente en la sobreexpresión de las mismas.

Todos los productos de la PCR 1 (ver Tabla 16) de las lipasas/esterasas candidatas utilizados en el ensayo de producción de proteínas *in vitro*, se clonaron en el plásmido pBC SK(+) y se transformaron en *E. coli* BIVU111. Se seleccionaron los clones positivos y cada transformante se cultivó en medio TB o LB, incubándose a 37°C hasta alcanzar una DO_{600nm} entre 0,7 y 1. Estos cultivos se indujeron con 0,1 mM de salicilato, incubándose a 30°C durante 4 horas o a 20°C durante toda la noche. Para cada transformante y condición, se recogió el sobrenadante y la fracción intracelular (total, soluble e insoluble) proveniente del cultivo. Tanto a la fracción intracelular como a la extracelular se le midió la concentración de proteínas y la actividad transesterificadora e hidrolítica. También se analizaron las muestras en geles SDS-PAGE (Figuras 29 y 30).

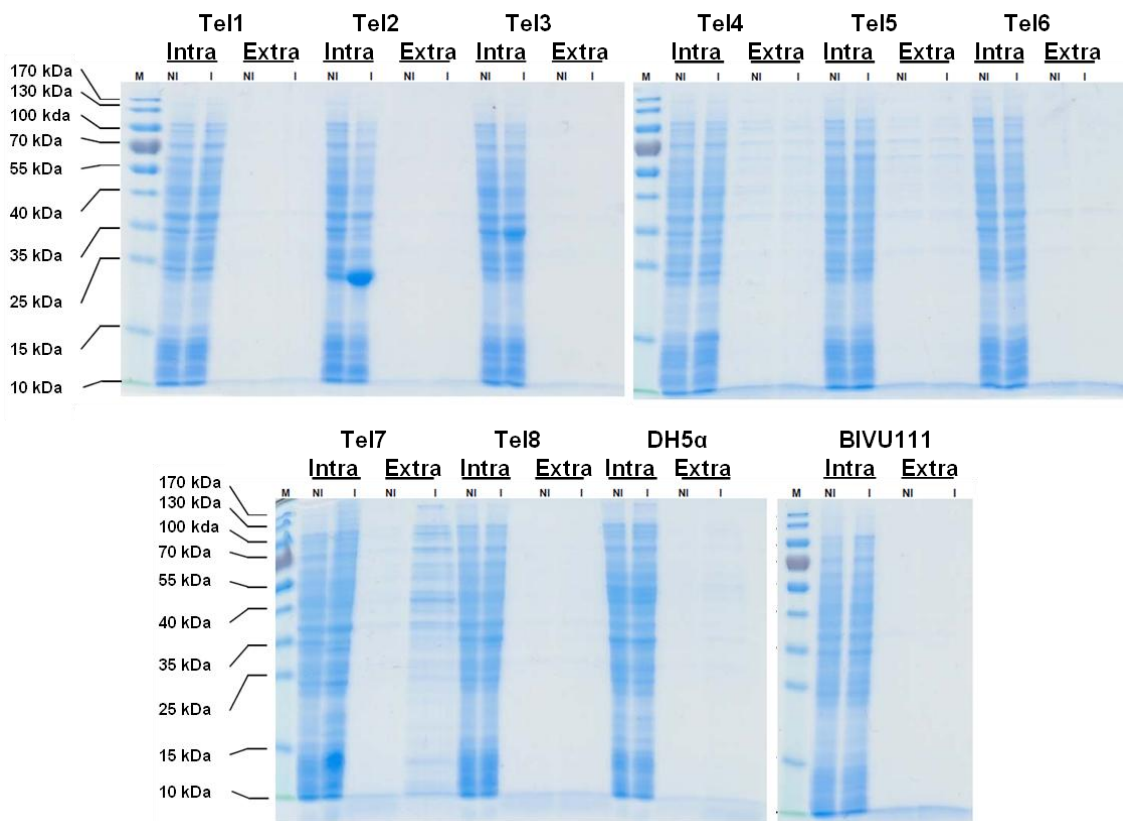


Figura 29. Geles SDS-PAGE de la fracción intracelular (Intra) y extracelular (Extra) de la sobreexpresión de las distintas proteínas candidatas de *Terribacillus* sp. AE2B 122 en *E. coli* BIVU111 a 20°C e inducidas con 0,1 mM de salicilato (I) y sin inducir (NI). Se cargaron entre 12 y 20 μ l de muestras (7,5 μ g). BIVU111: *E. coli* BIVU111 sin transformar; Tel1: *E. coli* BIVU111/Tel1; Tel2: *E. coli* BIVU111/Tel2; Tel3: *E. coli* BIVU111/Tel3; Tel4: *E. coli* BIVU111/Tel4; Tel5: *E. coli* BIVU111/Tel5; Tel6: *E. coli* BIVU111/Tel6; Tel7: *E. coli* BIVU111/Tel7; Tel8: *E. coli* BIVU111/Tel8

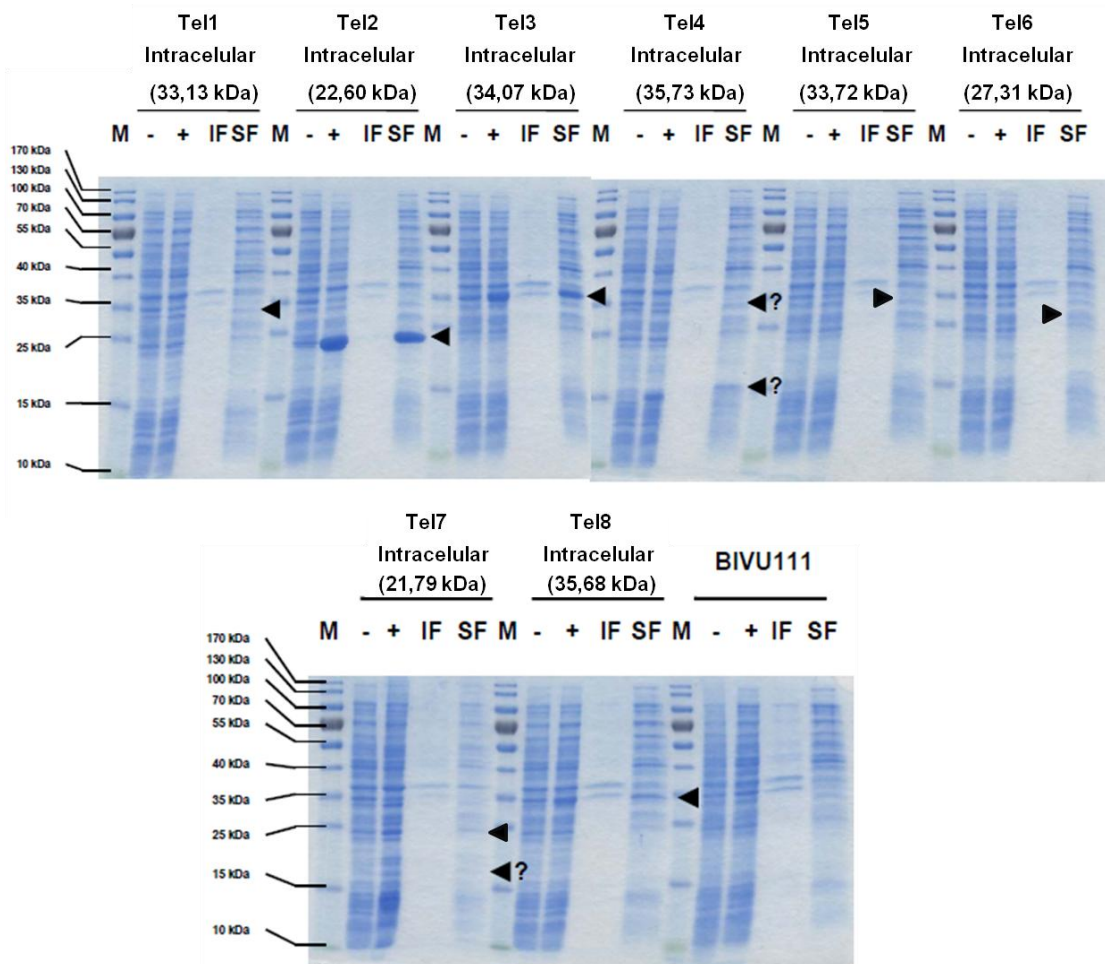


Figura 30. Geles SDS-PAGE de la fracción intracelular de la sobreexpresión de las distintas proteínas candidatas de *Terribacillus* sp. AE2B 122 en *E. coli* BIVU111 a 20°C e inducidas (+) con 0,1 mM de salicilato o sin inducir (-) y distinguiendo entre fracción soluble (SF) e insoluble (IF). Se cargaron entre 12 y 20 μ l de muestras (7,5 μ g). BIVU111: *E. coli* BIVU111 sin transformar; Tel1: *E. coli* BIVU111/Tel1; Tel2: *E. coli* BIVU111/Tel2; Tel3: *E. coli* BIVU111/Tel3; Tel4: *E. coli* BIVU111/Tel4; Tel5: *E. coli* BIVU111/Tel5; Tel6: *E. coli* BIVU111/Tel6; Tel7: *E. coli* BIVU111/Tel7; Tel8: *E. coli* BIVU111/Tel8. Las flechas indican las proteínas de interés

En todos los casos los geles muestran bandas de los tamaños (KDa) esperados, sugiriendo que los genes se expresaron en las fracciones intracelulares (Figuras 29 y 30). En el gel donde se diferencia fracción intracelular soluble e insoluble (Figura 30), se aprecia que en todos los casos las proteínas se recuperaron en la fracción intracelular soluble. En los únicos casos donde la sobreexpresión resultó evidente fue para las proteínas Tel2, Tel3 y Tel8 (Figuras 29 y 30).

En primer lugar se midió la actividad hidrolítica (específica y total), de las fracciones intracelulares de los transformantes. Como controles se utilizaron las actividades hidrolíticas de la fracción intracelular de *E. coli* DH5 α y extracelular de *Terribacillus* sp. AE2B 122 (Figuras 31 y 32). Se utilizaron dos tipos de controles de *Terribacillus* sp. AE2B 122, fracción extracelular concentrada y dializada en TPK-SA (1) y sin concentrar (2). Cada serie de experimentos se realizó por duplicado. De cada actividad se muestran las medias y errores de cada muestra.

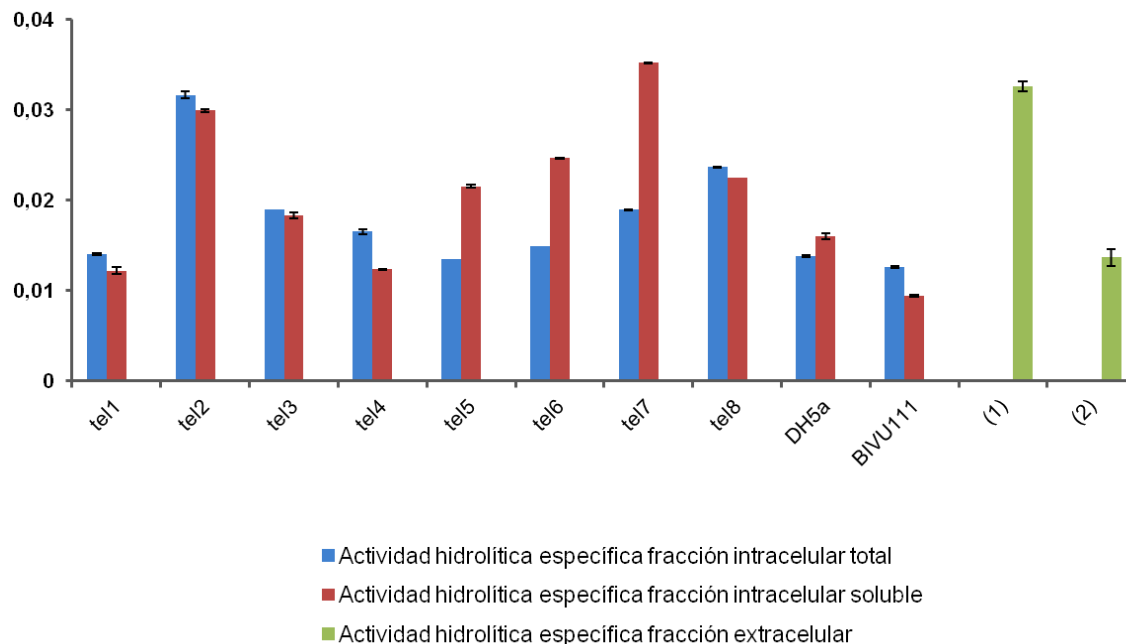


Figura 31. Valores de actividad hidrolítica específica (μ moles *pNP*/h/mg proteínas en la fracción liofilizada) de las fracciones intracelulares totales, intracelulares solubles y extracelulares. (1): resultados de actividad con el sobrenadante de *Terribacillus* sp. AE2B 122, crecido en medio PYA + 1,5% NaCl, a 30°C y 200 rpm, durante 72 h, concentrado con PEG y dializado con TPK+SA; (2): resultados de actividad con el sobrenadante de *Terribacillus* sp. AE2B 122, crecido en PYA + 1,5% NaCl, a 30°C y 200 rpm, durante 72 h; DH5 α : resultados de actividad de la fracción intracelular de *E. coli* DH5 α , crecido en medio LB a 30°C y 200 rpm durante 20h. tel1, tel2, tel3, tel4, tel5, tel6, tel7 y tel8: fracción intracelular del transformante de *E. coli* BIVU111 que expresa el gen de una de las proteínas candidatas, crecido en LB, a 37°C, e inducido 20h a 20°C y con 0,1 mM de salicilato; BIVU111: control con la cepa *E. coli* BIVU111 sin plásmido

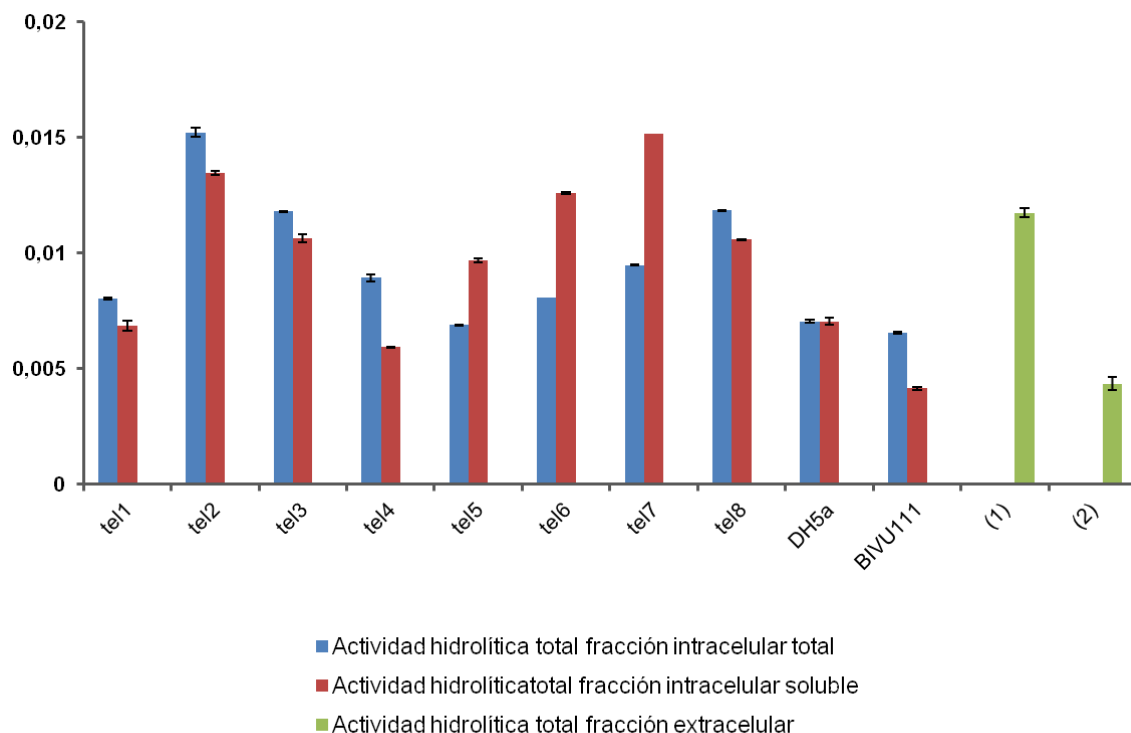


Figura 32. Valores de actividad hidrolítica total ($\mu\text{moles pNP/h/ml}$ fracción) de las fracciones intracelulares totales, intracelulares solubles y extracelulares. (1): resultados de actividad con el sobrenadante de *Terribacillus* sp. AE2B 122, crecido en PYA + 1,5% NaCl, a 30°C y 200 rpm, durante 72 h, concentrado con PEG y dializado con TPK+SA; (2): resultados de actividad con el sobrenadante de *Terribacillus* sp. AE2B 122, crecido en PYA + 1,5% NaCl, a 30°C y 200 rpm, durante 72 h; DH5 α : resultados de actividad con la fracción intracelular de *E. coli* DH5 α , crecido en LB a 30°C y 200 rpm durante 20h. tel1, tel2, tel3, tel4, tel5, tel6, tel7 y tel8: fracción intracelular del transformante de *E. coli* BIVU111 que expresa el gen de una de las proteínas candidatas, crecido en LB, a 37°C, e inducido 20h a 20°C y con 0,1 mM de salicilato; BiVU111: control con la cepa *E. coli* BIVU111 sin plásmido

Observando los resultados de la actividad hidrolítica específica y total se aprecia que la actividad de las proteínas Tel3, Tel6 y Tel8, expresadas en *E. coli* BIVU111, iguala el valor de actividad total de *Terribacillus* sp. AE2B 122, pero los valores más altos los presentan las enzimas candidatas Tel2 y Tel7, tanto en actividad hidrolítica específica como total (Figuras 31 y 32). En el caso de la actividad hidrolítica, el tratamiento de concentración del sobrenadante de *Terribacillus* sp. AE2B 122 [condiciones experimentales (1)] aumentó su actividad.

Los valores de actividad hidrolítica específica y total son distintos debido a que la referencia utilizada es diferente. En el caso de la actividad total se utiliza como referencia el volumen (ml) de fracción liofilizada y en la específica se utiliza la cantidad (mg) de proteínas en esa fracción liofilizada. Hay que interpretar convenientemente ambos valores de actividad ya que se trata de fracciones celulares con mezcla de proteínas desconocidas y no de una única proteína purificada. Por tanto, podríamos descartar fracciones con enzimas deseadas debido a que estas fracciones pueden contener gran cantidad de otras proteínas sin la actividad deseada, lo que reduciría notablemente el valor de actividad específica. En el caso de la actividad total, la cantidad de proteína no afecta al resultado, ya que las unidades se expresan por volumen (ml) de fracción.

En paralelo se determinaron la actividad transesterificadora (específica y total), de las mismas fracciones intracelulares y extracelulares (Figuras 33 y 34).

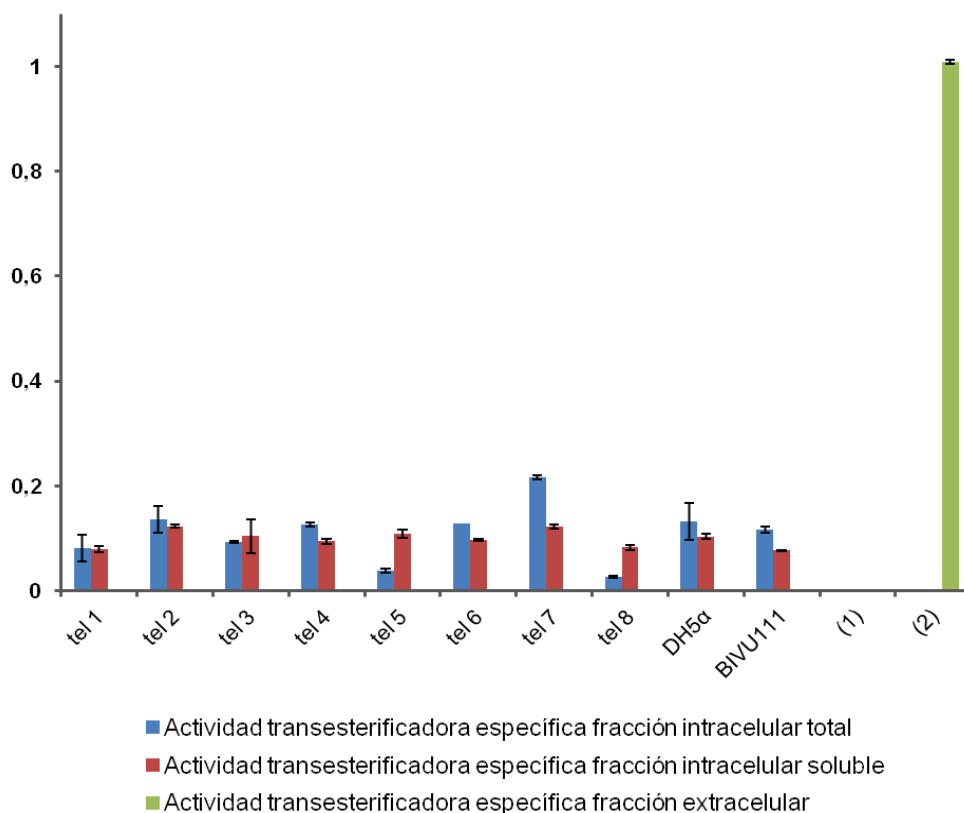


Figura 33. Valores de actividad transesterificadora específica ($\mu\text{moles } p\text{NP/h/mg}$ de proteínas en la fracción liofilizada) de las fracciones intracelulares totales, intracelulares solubles y extracelulares. (1): resultados de actividad con el sobrenadante de *Terribacillus* sp. AE2B 122, crecido en PYA + 1,5% NaCl, a 30°C y 200 rpm, durante 72 h, concentrado con PEG y dializado con TPK+SA; (2): resultados de actividad con el sobrenadante de *Terribacillus* sp. AE2B 122, crecido en PYA + 1,5% NaCl, a 30°C y 200 rpm, durante 72 h; DH5 α : resultados de actividad con la fracción intracelular de *E. coli* DH5 α , crecido en LB a 30°C y 200 rpm durante 20h. tel1, tel2, tel3, tel4, tel5, tel6, tel7 y tel8: fracción intracelular del transformante de *E. coli* BIVU111 que expresa el gen de una de las proteínas candidatas, crecido en LB, a 37°C, e inducido 20h a 20°C y con 0,1 mM de salicilato; BiVU111: control con la cepa *E. coli* BIVU111 sin plásmido

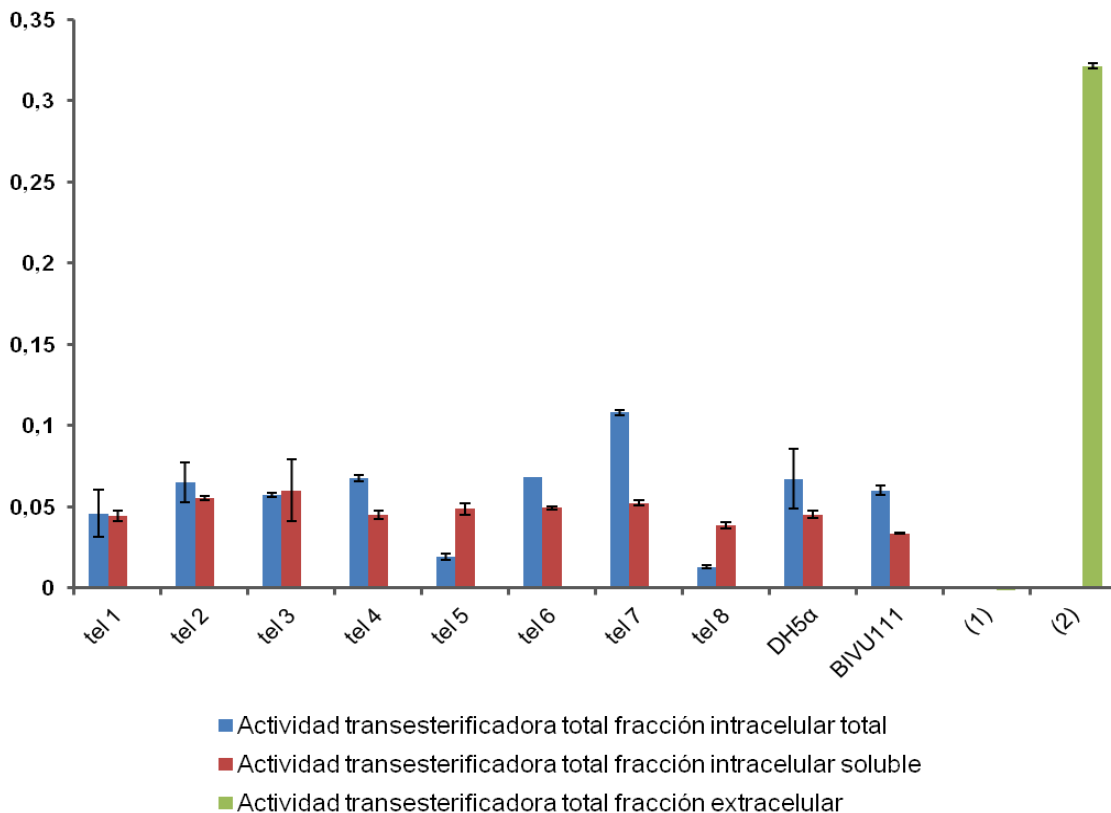


Figura 34. Valores de actividad transesterificadora total ($\mu\text{moles pNP/h/ml}$ fracción) de las fracciones intracelulares totales, intracelulares solubles y extracelulares. *Terribacillus* sp. AE2B 122 (1): resultados de actividad con el sobrenadante de *Terribacillus* sp. AE2B 122, crecido en PYA + 1,5% NaCl, a 30°C y 200 rpm, durante 72 h, concentrado con PEG y dializado con TPK+SA; *Terribacillus* sp. AE2B 122 (2): resultados de actividad con el sobrenadante de *Terribacillus* sp. AE2B 122, crecido en PYA + 1,5% NaCl, a 30°C y 200 rpm, durante 72 h; DH5 α 20h: resultados de actividad con la fracción intracelular de *E. coli* DH5 α , crecido en LB a 30°C y 200 rpm durante 20h. tel1, tel2, tel3, tel4, tel5, tel6, tel7 y tel8: fracción intracelular del transformante de *E. coli* BIVU111 que expresa el gen de una de las proteínas candidatas, crecido en LB, a 37°C, e inducido 20h a 20°C y con 0,1 mM de salicilato; BiVU111: control con la cepa *E. coli* BIVU111 sin plásmido

En las medidas de actividad transesterificadora específica y total de las enzimas en la fracción intracelular (soluble y total), ninguna muestra superó ni igualó la actividad del sobrenadante de la cepa *Terribacillus* sp. AE2B 122. Es importante destacar que la proteína Tel7 mostró la mayor actividad transesterificadora entre las proteínas candidatas, sin ser esta proteína una de las que se sobreexpresaron adecuadamente.

En el caso de la actividad transesterificadora, al contrario que para la actividad hidrolítica, el tratamiento de concentración realizado al sobrenadante de la bacteria afectó drásticamente a la actividad, haciéndola desaparecer (Figuras 33 y 34).

Con las mismas fracciones celulares de la sobreexpresión en *E. coli* BIVU111, se realizó un ensayo de hidrólisis del sustrato MUF-butirato en placa multipocillo (Figura 35), donde se observó actividad de las enzimas Tel2, Tel3, Tel4, Tel7 y Tel8, siendo Tel3 y Tel8 las que más destacaron.

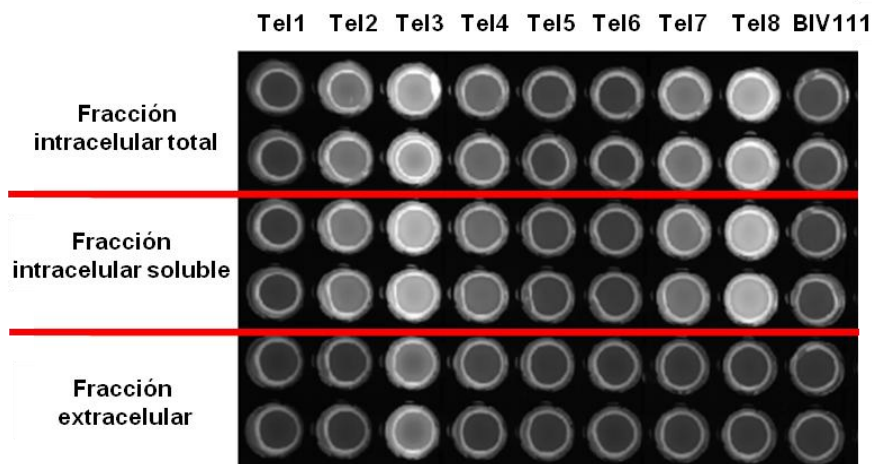


Figura 35. Valores de actividad hidrolítica del sustrato MUF-butirato utilizando las distintas fracciones celulares de las lipasas candidatas sobreexpresadas en *E. coli* BIVU111. Tel1, Tel2, Tel3, Tel4, Tel5, Tel6, Tel7 y Tel8: proteínas candidatas expresadas en *E. coli* BIVU111 crecida en LB, a 37°C, e inducida 20h a 20°C, con 0,1 mM de salicilato; BiVU111: control con la cepa *E. coli* BIVU111 sin plásmido

3.3.2.6. Estrategia 6. Purificación de la proteína responsable de la actividad transesterificadora a partir del sobrenadante del cultivo de *Terribacillus* sp. AE2B 122

Debido a que con las estrategias anteriores no se llegó a resultados concluyentes, se procedió al intento de purificación de la enzima transesterificadora a partir del sobrenadante de *Terribacillus* sp. AE2B 122. Para la purificación se cultivó la bacteria en las condiciones óptimas para la detección de actividad transesterificadora determinadas previamente (PYA + 1,5% NaCl, a 30°C y 200 rpm, durante 72 h).

En primer lugar se utilizó la cromatografía de intercambio hidrofóbico (CIH), ya que se conoce que las lipasas son enzimas altamente hidrofóbicas (Ribeiro y col., 2011). La CIH se realizó siguiendo el protocolo que se detalla en Materiales y Métodos.

Se partió de un cultivo de 2 L de *Terribacillus* sp. AE2B 122, el sobrenadante de ese cultivo se concentró y posteriormente se dializó en TPK 0,05 M pH 7,6 adicionado con 10% de sulfato de amonio (SA). El volumen recuperado se filtró y utilizó en la purificación por CIH, donde se recuperaron 22 fracciones de 4 ml, que se concentraron con PEG y se dializaron en TPK 0,05 M y pH 7,6. Este paso de separación se repitió 11 veces, determinando en cada ocasión la actividad transesterificadora total y específica de cada fracción. A continuación se muestra un ejemplo de resultados de actividad total (Figura 36) y específica (Figura 37).

En el caso de la actividad transesterificadora total (Figura 36) aparecen cuatro zonas de mayor actividad (rectángulos rojos), que aparecieron consistentemente en todas las repeticiones de la purificación mediante CIH.

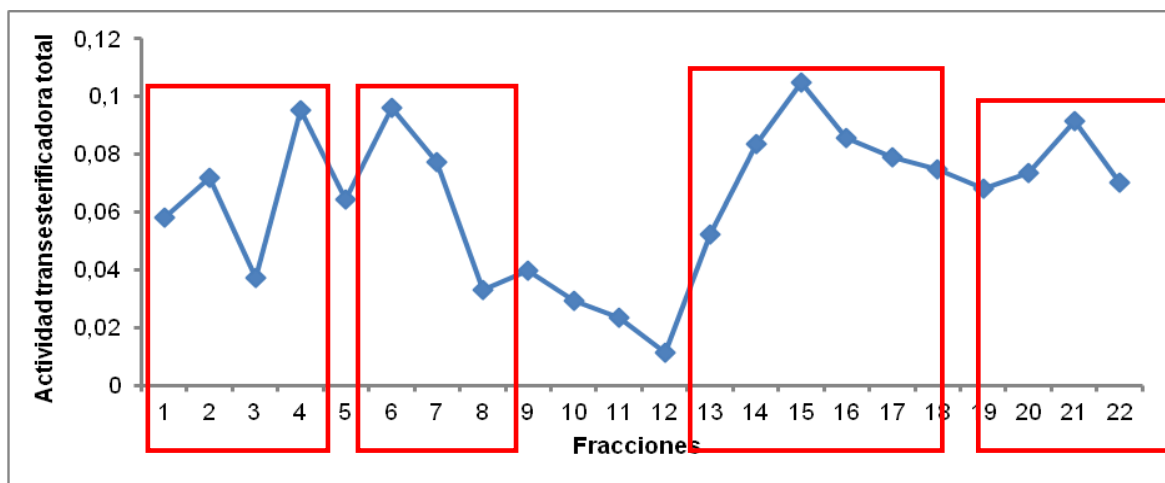


Figura 36. Resultados de la actividad transesterificadora total ($\mu\text{moles pNP/h/ml}$ sobrenadante liofilizado) de un ejemplo representativo de la separación por CIH del sobrenadante de *Terribacillus* sp. AE2B 122

La actividad específica es el resultado del cociente entre la actividad total y la concentración de proteínas en la fracción utilizada (Figura 37), que a diferencia de la actividad total, sólo muestra una zona de actividad con las primeras fracciones recogidas en la separación.

Esto se debe a que la concentración de proteínas en las fracciones aumentó a lo largo de la separación, siendo las últimas proteínas las de mayor superficie hidrofóbica. Estas proteínas corresponden a la concentración de una mezcla de proteínas entre las que podría estar la enzima responsable de la actividad buscada. De esta forma, la concentración de proteínas distintas a la proteína responsable de la actividad transesterificadora podría enmascarar una zona de fracciones con la actividad deseada. Por tanto, se utilizarán las cuatro zonas de actividad detectadas en los ensayos de actividad total, para no descartar ninguna fracción que pudiera contener la enzima deseada. Es decir, se trató de minimizar el riesgo de perder las fracciones de interés, aumentando los posibles falsos positivos.

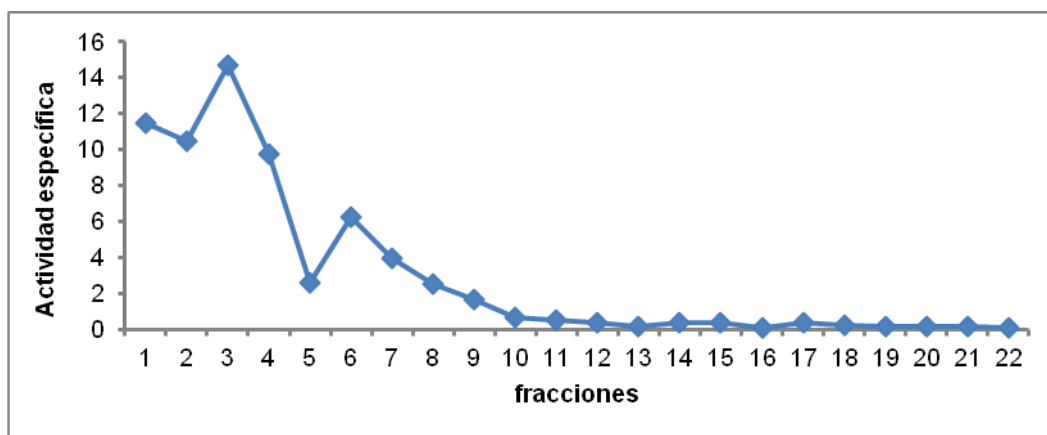


Figura 37. Resultados de la actividad transesterificadora específica ($\mu\text{moles } p\text{NP/h/mg}$ proteínas en la fracción liofilizada) de un ejemplo de separación por CIH del sobrenadante de *Terribacillus* sp. AE2B 122

Tras la separación de las proteínas mediante CIH, se prosiguió con el análisis de las proteínas de las 4 zonas de actividad en geles SDS-PAGE (Figuras 38 y 39).

En la primera zona de actividad (Figura 38), se observaron dos bandas en la mayoría de las fracciones de las distintas repeticiones de la separación cromatográfica, una banda de 40-50 KDa y otra menor de ≈ 25 KDa. En las fracciones de la 4ª repetición, el bandeo fue distinto y además de las dos bandas mencionadas aparecieron muchas otras.

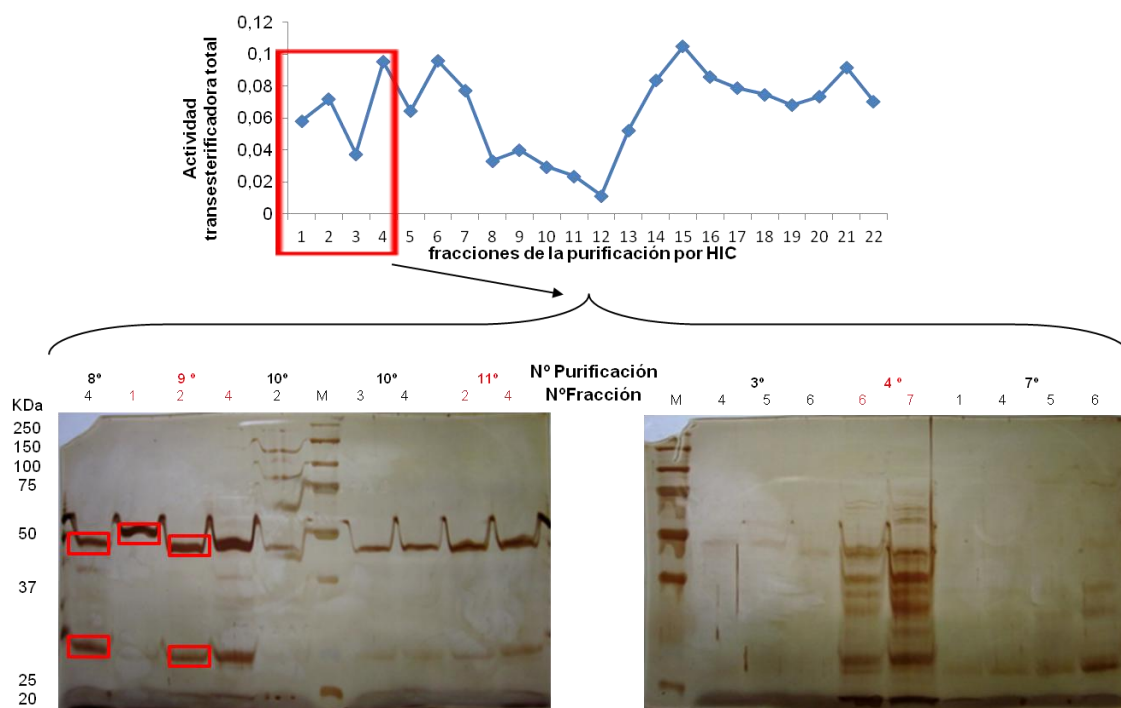


Figura 38. Gel SDS-PAGE teñido con plata, de varios ejemplos de las fracciones de la primera zona de actividad en la separación mediante CIH. 3°, 4°, 7°, 8°, 9°, 10° y 11°: el número de la purificación; 1,2,3....etc.: número de la fracción y M: marcador de peso molecular

Las bandas marcadas en el gel se seleccionaron por ser las únicas que aparecían en las fracciones activas de la primera zona de la separación por CIH (Figura 38). Estas bandas se identificaron por espectrometría de masas en el servicio de proteómica del INIBIC CH Universitario de A Coruña. Las 3 bandas superiores resultaron ser la misma proteína, una dihidrolipoamida deshidrogenasa del complejo piruvato deshidrogenasa, una proteína de 45 KDa, lo que también coincidía con el tamaño esperado en el gel. Las dos bandas menores mostraban similitud de secuencias con la enzima N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa, de 27,2 KDa. Ninguna de estas proteínas se esperaba que tuviera actividad lipolítica ni transesterificadora de acuerdo con la predicción de su secuencia, por lo que se descartaron. A continuación, se procedió a unificar y concentrar todas las fracciones de esta primera zona de actividad de las 7 repeticiones de la separación por CIH.

Con esto se pretendía ver si concentrando todas las muestras aparecía alguna banda que en su origen estuviera en menor cantidad (ya que se producía una concentración de 10 a 13 veces con respecto a la muestra original). Las proteínas de esta primera unificación (UA1) se separaron en un gel de SDS-PAGE junto a las fracciones adyacentes sin actividad (Figura 39).

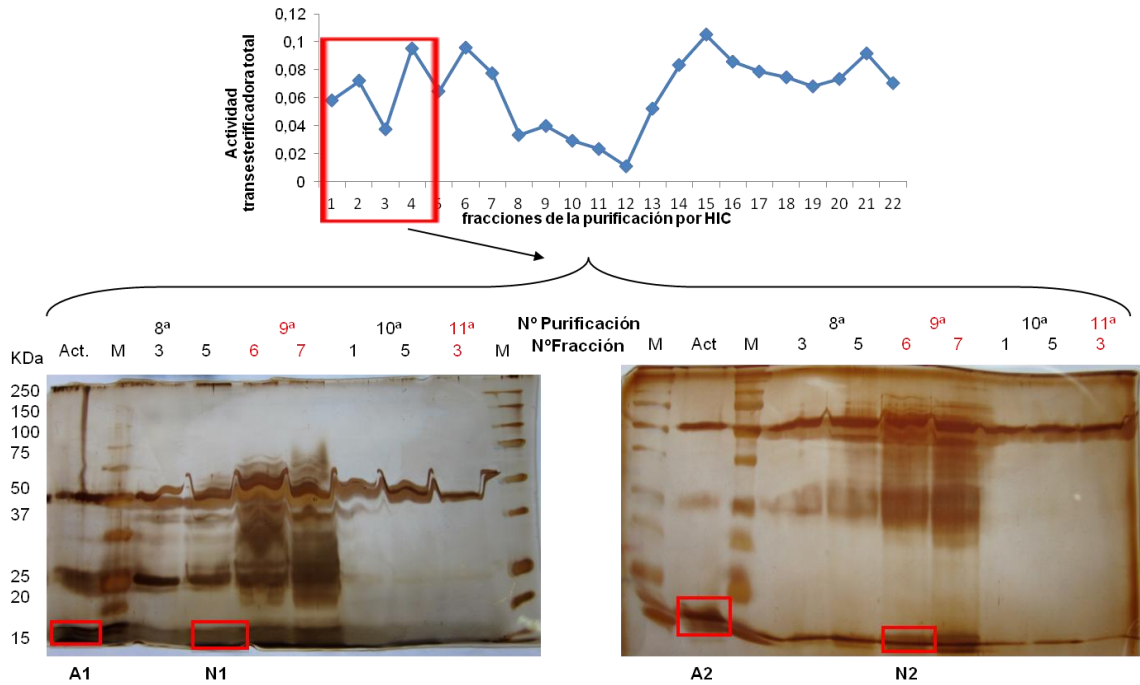


Figura 39. SDS-PAGE teñido con plata, de la unificación UA1 y de las fracciones sin actividad adyacentes a la primera zona de actividad en la separación por CIH. 3^o, 4^o, 7^o, 8^o, 9^o, 10^o y 11^o: el número de la purificación; 1, 2, 3....etc.: número de la fracción; Act.: Unificación UA1 de las fracciones activas de la primera zona de actividad de las purificaciones por CIH y M: marcador de peso molecular

Tras estos nuevos análisis se observó, que las bandas analizadas con anterioridad, aparecían también en las fracciones sin actividad, por lo que podríamos deducir que esas bandas no eran las responsables de la actividad buscada. En estos nuevos geles (Figura 39) se observó una zona del gel a la altura de 15 KDa, donde parecía existir una banda que no aparecía en las fracciones sin actividad. Se cortó el fragmento entero (A1 y A2), ya que era imposible recortar la banda únicamente, y se analizó por espectrometría de masas, junto a un fragmento de la misma zona del gel de una de las fracciones sin actividad (N1 y N2) que se utilizó como control negativo.

Del fragmento A1 se recuperó una proteína cuya secuencia presentaba similitud con una tiorredoxina (11,4 KDa) y la proteína hipotética 1592 de la anotación del genoma de *Terribacillus* sp. AE2B 122. En la banda N1 sin embargo no se detectó nada. Este procedimiento se repitió una vez más, y en el análisis de A2 se detectó nuevamente una proteína que mostraba similitud con la tiorredoxina, y la proteína hipotética 3317 de la anotación del genoma de *Terribacillus* sp. AE2B 122. En este caso sí se pudieron detectar péptidos en la región sin actividad N2, donde se identificaron 2 proteínas: una con similitud a la tiorredoxina y otra con similitud a un regulador transcripcional CDS-ID OB0894. Por tanto, tras los análisis bioinformáticos ninguna de estas proteínas encontradas parecía ser la responsable de la actividad buscada.

Para las siguientes zonas de la separación por CIH se decidió someter a las fracciones a un segundo paso de separación, con el objeto de purificar más las fracciones para eliminar otras proteínas y poder identificar la enzima responsable de la actividad transesterificadora.

Se decidió analizar la 2ª zona de actividad total de la purificación por CIH, unificando las fracciones de esa zona de las 7 repeticiones (UA2), concentrándolas con PEG 8 KDa y dializándolas con TPK 0,05 M pH 7,6. El volumen recuperado se filtró a través de un filtro de membrana con un diámetro de poro de 0,45 μm y se dividió en tres fracciones para repetir tres veces el paso por cromatografía de exclusión atómica (CEA). Las fracciones recuperadas se utilizaron para ensayos de actividad transesterificadora, calculando tanto la actividad específica según la concentración de proteínas en la fracción utilizada (Figura 40 A), como la actividad total por cada ml de fracción (Figura 40 B).

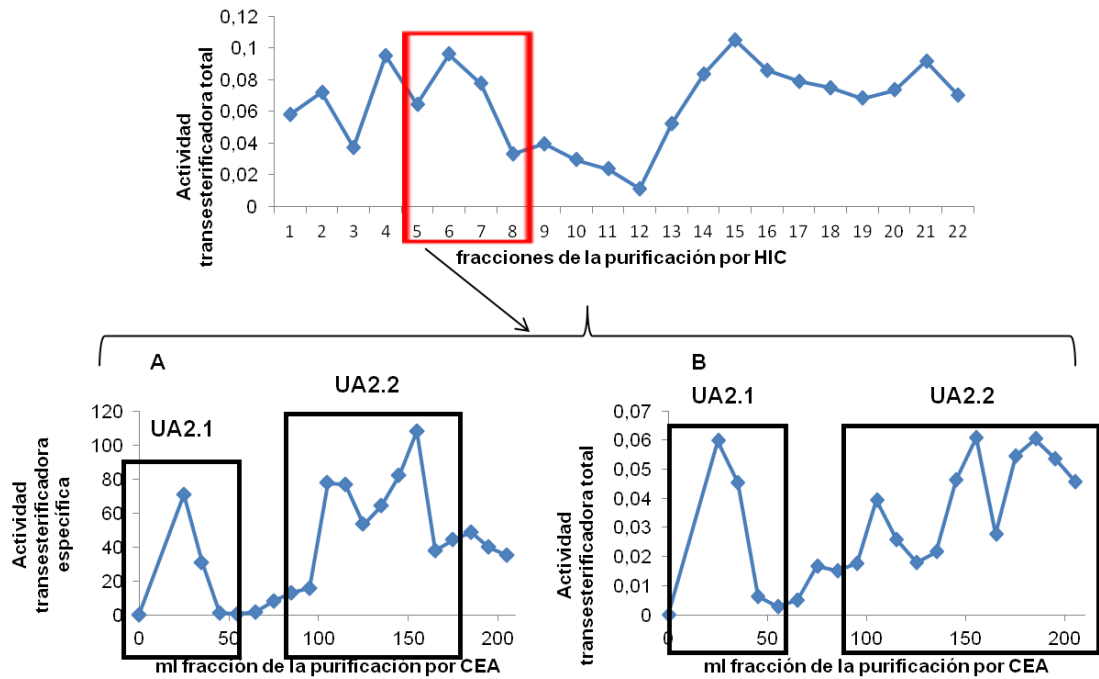


Figura 40. Resultados de actividad específica ($\mu\text{moles } p\text{NP/h/mg}$ proteínas en la fracción liofilizada) (A) y total ($\mu\text{moles } p\text{NP/h/ml}$ de fracción liofilizada) (B) de las fracciones recogidas en uno de los ensayos de la separación por CEA de la fracción UA2

En todas las repeticiones que se realizaron se observaron dos zonas de mayor actividad (rectángulos negros), una primera zona más regular, y una segunda zona no tan regular, tanto en la actividad total como en la específica. Se analizaron esas dos zonas, junto a fracciones sin actividad, en geles de SDS-PAGE. Tras teñirlos con plata, solo apreciamos bandas proteicas en uno de los geles (figura 41).

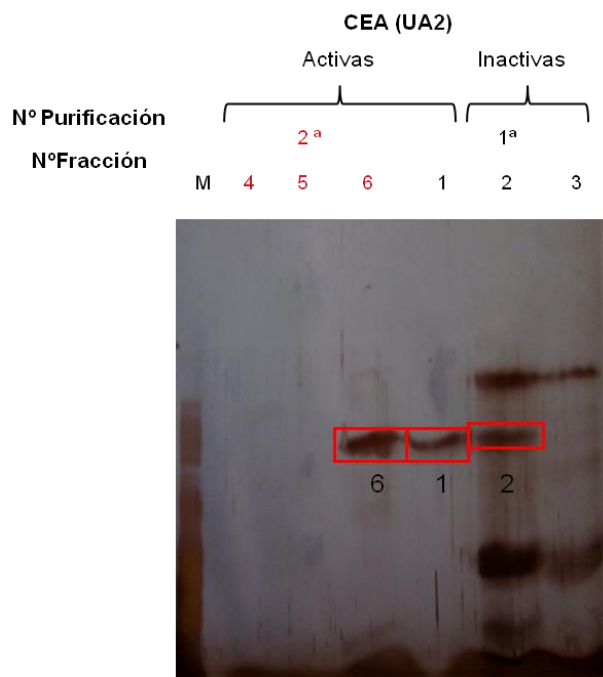


Figura 41. Gel SDS-PAGE de fracciones activas e inactivas de distintas repeticiones de la purificación por CEA de UA2. 1^a y 2^a: el número de la repetición de la purificación; 1, 2, 3...etc.: número de la fracción y M: marcador de peso molecular. Las fracciones de la 2^a repetición 4, 5 y 6 y la fracción 1 de la repetición 1^a eran fracciones activas. Las fracciones 2 y 3 de la 1^a repetición no eran activas.

Se analizaron por espectrometría de masas tres bandas, una única banda que apareció en las 2 fracciones con actividad (banda 6: fracción 6 de la 2^a repetición; y banda 1: fracción 1 de la 1^a repetición) y una banda de una fracción sin actividad (banda 2: fracción 2 de la 1^a repetición). En los tres casos se identificó una proteína con homología a una enzima aminopeptidasa desbloqueante, que no sugería tener relación ninguna con la actividad transesterificadora.

La tercera zona de actividad de la separación por CIH, se sometió al mismo procedimiento de unificación y concentración que la segunda zona, se unificaron las fracciones de las 7 repeticiones (UA3). Tras este proceso, se dividió el volumen recuperado en tres alícuotas y se sometió a una purificación por CEA. Las fracciones recuperadas se utilizaron para la determinación de la actividad transesterificadora, calculándose tanto su actividad específica (Figura 42 A), como total (Figura 42 B).

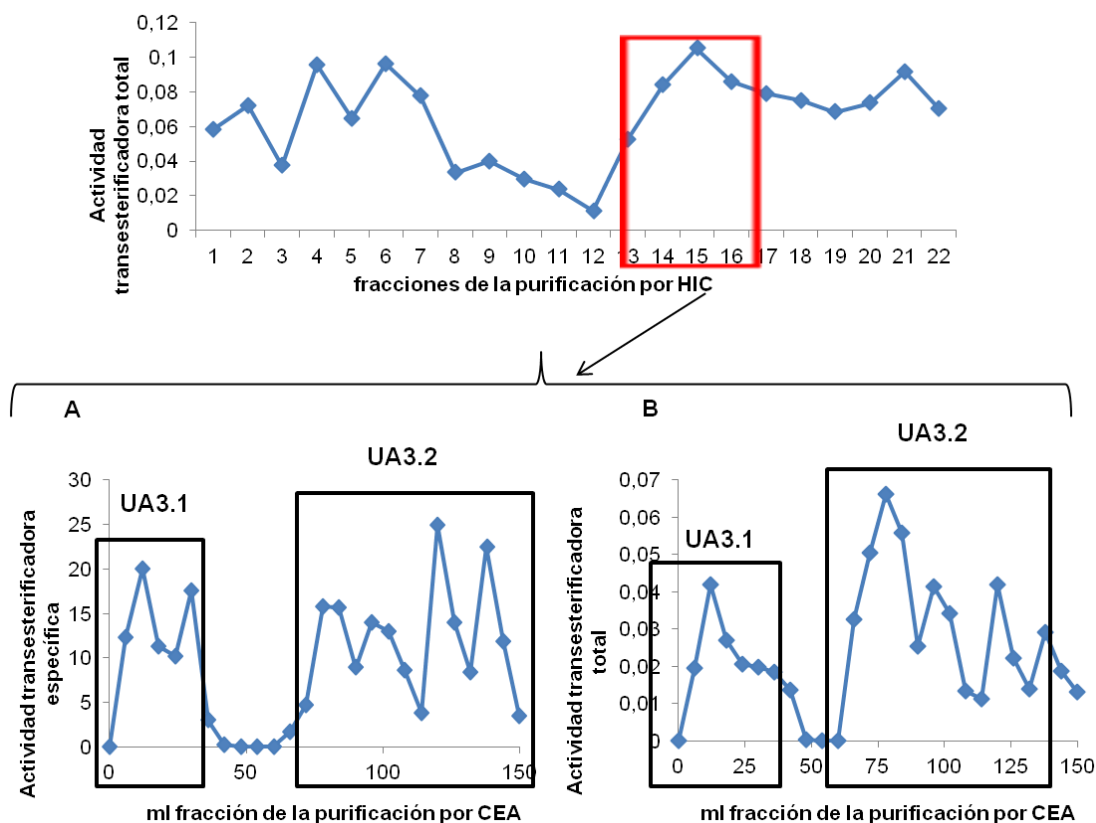


Figura 42. Resultados de actividad específica ($\mu\text{moles } p\text{NP/h/mg}$ proteínas en la fracción liofilizada) (A) y total ($\mu\text{moles } p\text{NP/h/ml}$ de fracción liofilizada) (B) de las fracciones recogidas en la separación por CEA de la fracción UA3

En la Figura 42 se muestra un ejemplo de una de las repeticiones de la cromatografía de UA3. En este caso, vuelven a aparecer dos zonas de actividad, que también se analizaron en geles SDS-PAGE teñidos con plata, pero no se detectó ninguna banda en las fracciones de mayor actividad.

Para la cuarta y última zona de actividad de CIH, se siguió el mismo procedimiento que para las otras tres zonas, generando la unificación UA4 que también se sometió a CEA y cuyas fracciones también se usaron para analizar su actividad transesterificadora (Figura 43).

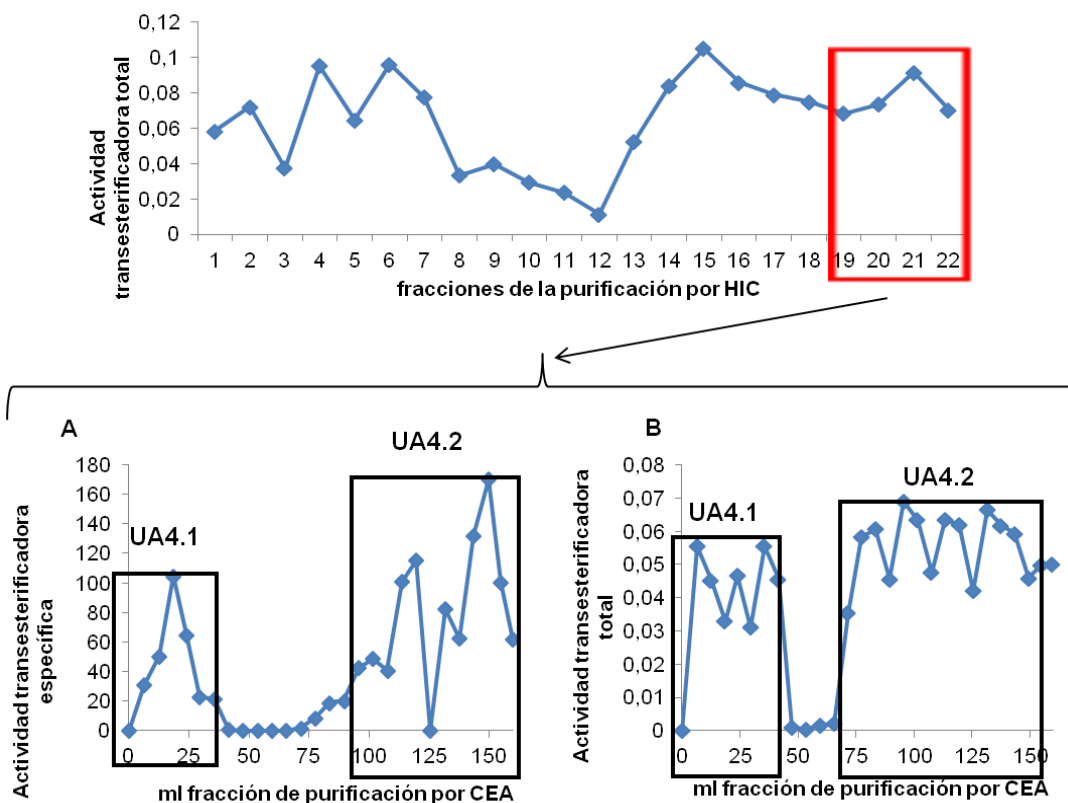


Figura 43. Resultados de actividad específica ($\mu\text{moles } p\text{NP/h/mg}$ proteínas en la fracción liofilizada) (A) y total ($\mu\text{moles } p\text{NP/h/ml}$ de fracción liofilizada) (B) de las fracciones recogidas en la separación por CEA de la fracción UA4

Se observa que vuelven a aparecer dos zonas de actividad de las que tampoco se logró detectar bandas en geles SDS-PAGE para poder analizar por espectrometría de masas. En la Figura 43 se muestra sólo un ejemplo de las tres repeticiones.

A lo largo de la purificación, la actividad específica media por mg de proteína en la fracción utilizada (≈ 1) y la actividad total media ($\approx 0,22$) de los sobrenadantes usados para las 7 purificaciones van cambiando. La actividad específica aumenta en cada paso, al ir disminuyendo la concentración de proteínas totales en las fracciones, y la actividad total disminuye, puesto que podría perderse algo de la proteína responsable de la actividad buscada.

Por último se realizaron unificaciones de cada una de las dos zonas de actividad de cada repetición de la purificación por CEA de las fracciones UA2, 3 y 4, resultando las nuevas unificaciones UA2.1, UA2.2, UA3.1, UA3.2, UA4.1 y UA4.2, que junto a la unificación UA1 se liofilizaron y se realizó el ensayo de producción de Biodiésel a escala de laboratorio (Tabla 28).

Tabla 28. Análisis del Biodiésel producido mediante transesterificación del aceite de girasol utilizando las unificaciones de las purificaciones por CIH y CEA

	FAE (%)	Conversión (%)
UA1	16,74	22,10
UA2.1	22,40	64,68
UA2.2	21,02	34,04
UA3.1	18,51	20,57
UA3.2	33,24	41,44
UA4.1	21,82	37,12
UA4.2	28,52	35,9
SA*	39,64	39,66

*SA: fracción sin actividad, usado como control negativo

Tras los análisis de producción de Biodiésel, se comprobó que ninguna de las fracciones obtenidas de las purificaciones de *Terribacillus* sp. AE2B 122 era capaz de producir Biodiésel con la eficacia del sobrenadante del organismo de partida, de hecho no superaron ni al control negativo (fracción sin actividad de una de las separaciones por CEA), por lo que los valores de conversión y FAE de estas unificaciones se consideraron negativos.

Debido a los resultados hallados, se repitió la separación por HIC del sobrenadante concentrado de *Terribacillus* sp. AE2B 122 para el posterior análisis mediante zimograma con MUF-butirato de las fracciones recuperadas (Figura 44). En el zimograma se analizaron tanto las fracciones de la elución durante el gradiente hidrofóbico, como las fracciones anteriores al mismo, donde deben recuperarse las proteínas que no se hayan unido a la columna de HIC.

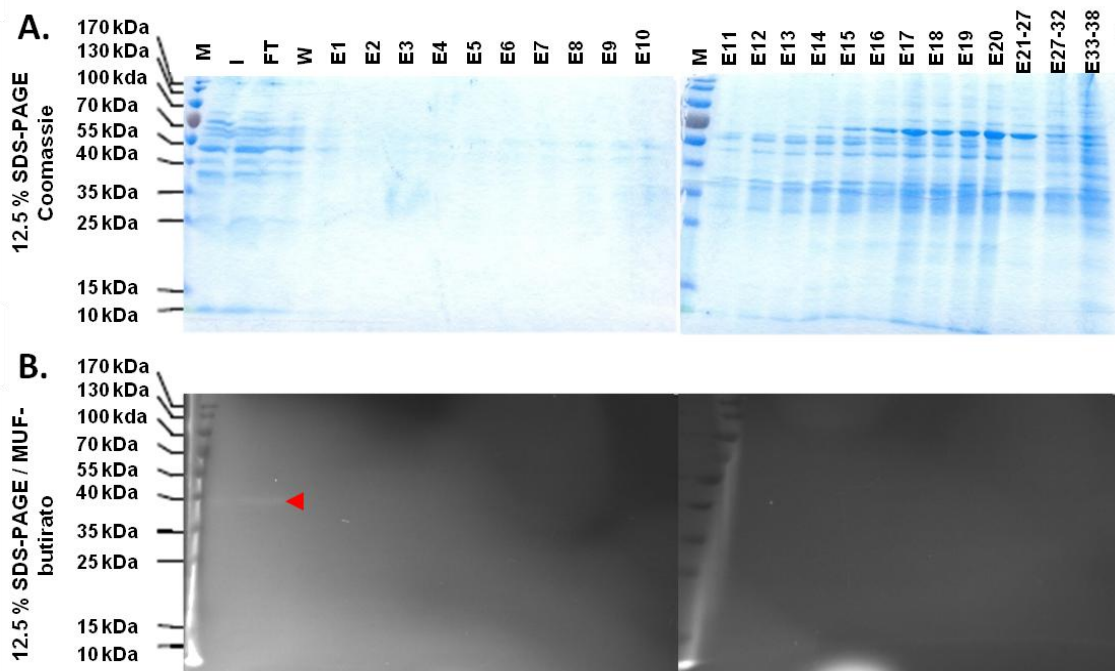


Figura 44. Gel SDS-PAGE de la purificación mediante HIC del sobrenadante de *Terribacillus* sp. AE2B 122 crecido en PYA + 1,5% NaCl, a 30°C y 200 rpm, durante 72 h, concentrado con PEG y dializado con TPK+SA. Los gels se trataron con solución Coomassie (A) o con MUF-butirato (B). M: marcador; I: sobrenadante de *Terribacillus* sp. AE2B 122 antes de purificar; FT: fracción no unida a la columna durante la inyección de la muestra en la purificación; W: fracción no unida a la columna durante el lavado con TPK-SA tras la inyección de la muestra en la purificación y E1-38: fracciones recogidas durante la elución en la purificación

Tras los resultados del zimograma con MUF-butirato (Figura 44), observamos que existe una proteína en el sobrenadante de *Terribacillus* sp. AE2B 122 de unos 40 KDa de tamaño, capaz de llevar a cabo la hidrólisis del compuesto MUF-butirato, que no permanece unida a la columna de HIC, o lo hace muy débilmente, durante la inyección de la muestra, por lo que en la primera fracción de elución E1 (Figura 44 A,) ya apenas se aprecia en el gel teñido con Coomassie la banda de la proteína responsable de esta actividad. Estos ensayos se repitieron (Figura 45), volviéndose a observar la misma banda de actividad hidrolítica, la cual se recortó y se analizó mediante espectrometría de masas.

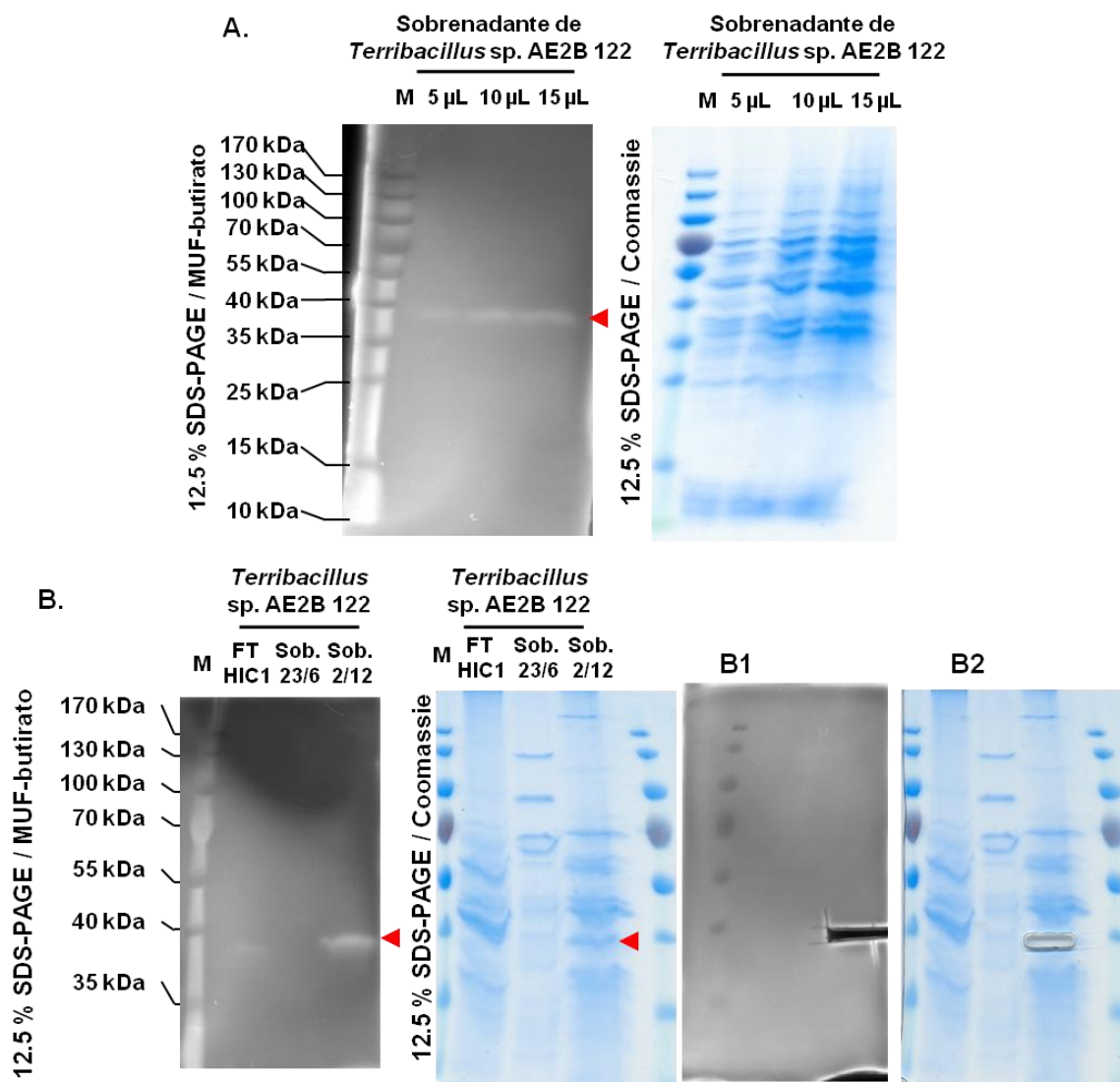


Figura 45. Gel SDS-PAGE. A. Cantidades crecientes del sobrenadante de *Terribacillus* sp. AE2B 122 crecido en PYA + 1,5% NaCl, a 30°C y 200 rpm, durante 72 h, concentrado con PEG y dializado con TPK+SA. B. Gel SDS-PAGE de sobrenadante de *Terribacillus* sp. AE2B 122 crecido en PYA + 1,5% NaCl, a 30°C y 200 rpm, durante 72 h, concentrado con PEG y dializado con TPK+SA (Sob.) y de la fracción no unida a la columna en la separación por HIC de este mismo sobrenadante (FT HIC1). Los geles se trataron con MUF-butirato o con solución Coomassie y se recortaron las bandas correspondientes a la zona de actividad hidrolítica (triángulo rojo), tanto en el gel tratado con MUF-butirato (B1) como en el gel teñido con Coomassie (B2)

Las bandas recortadas se analizaron por MASCOT (Figura 45, B1 y B2) realizando búsquedas combinadas de la huella peptídica (MS) y péptidos fragmentados (MS/MS), en la base de datos NCBI y en la que se generó con nuestros datos de la secuenciación del genoma de *Terribacillus* sp. AE2B 122. El análisis mostró la presencia de 2 proteínas mayoritarias. La proteína más abundante mostró homología con una gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa NAD-dependiente, la cual se detectó tanto en la banda B1 (tinción con MUF-butirato) como en la banda B2 (tinción con Coomassie) (Figura 45), aunque la intensidad relativa de esta proteína en la banda B1 fue aproximadamente 6 veces menor que en la banda B2. La otra proteína detectada mostró homología con una α/β hidrolasa de *Terribacillus aidingensis* (93% similitud)(gi|740779144|ref|WP_038564428.1|) (Figura 46).

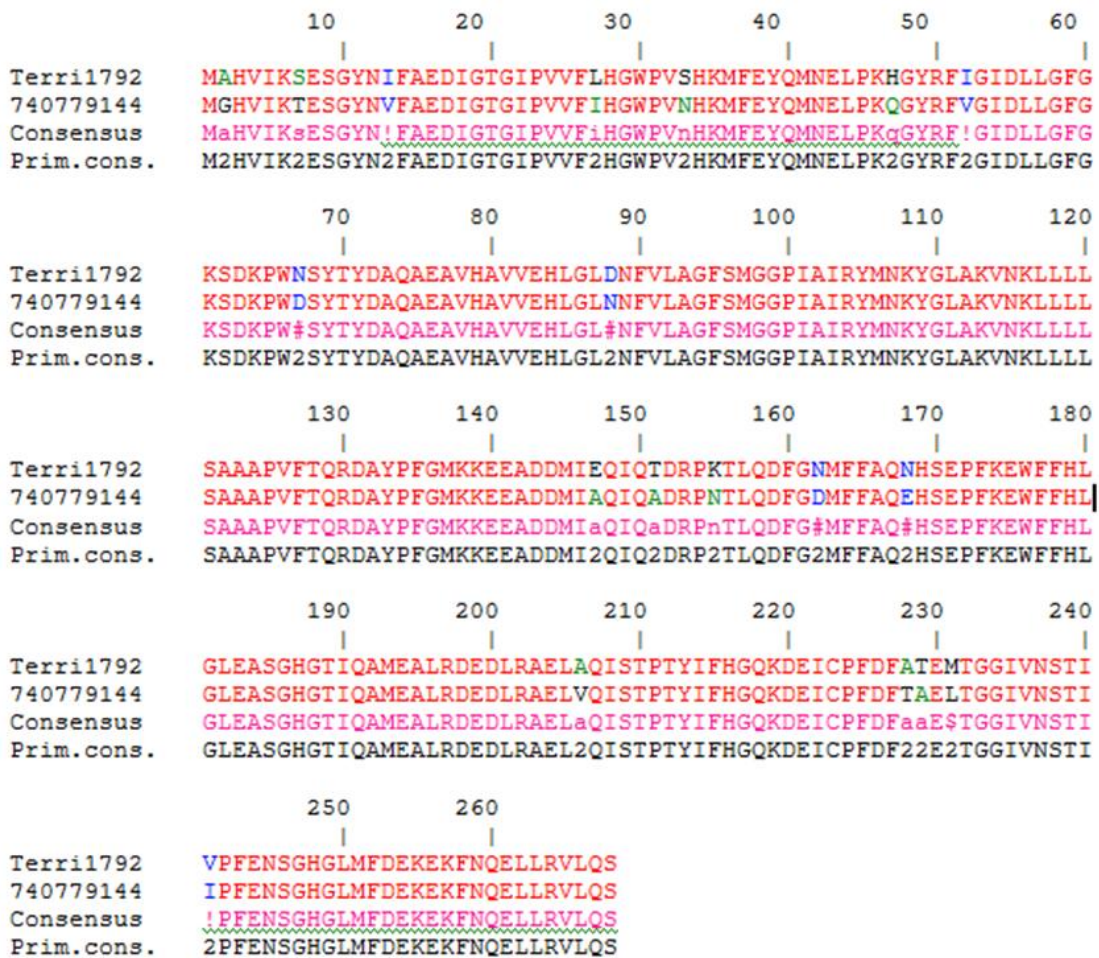


Figura 46. Alineamiento de las secuencias de las α/β hidrolasas de *Terribacillus* sp. AE2B 122 (Terri1792) y *Terribacillus aidingensis* gi|740779144 (740779144)

Esta α/β hidrolasa de *Terribacillus* sp. AE2B 122 (Tel9) fue anotada inicialmente como una proteína hipotética, por lo que pasó desapercibida hasta el momento de su detección en estos geles, cuando su análisis mediante BLAST mostró homología con una α/β hidrolasa-6 de la superfamilia de las lipasas/esterasas (Figura 47).

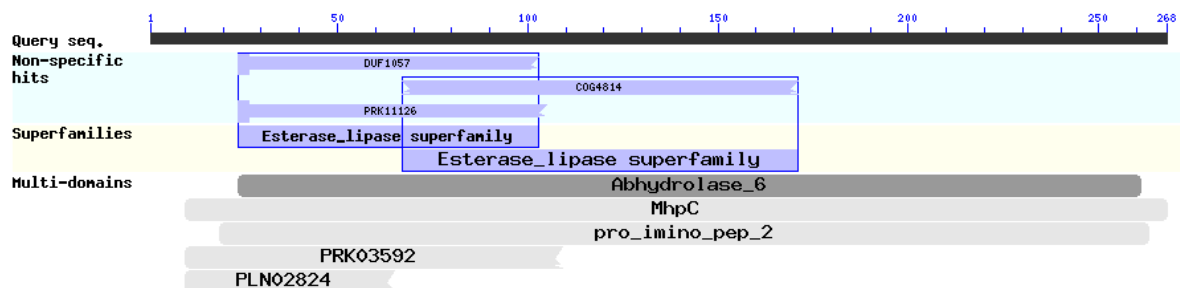


Figura 47. Resultado de la predicción de los dominios conservados de la secuencia de aminoácidos de la α/β hidrolasa Tel9 de *Terribacillus* sp. AE2B 122 mediante Blastp.

El análisis bioinformático de esta proteína sugirió que se trataba de una proteína citoplasmática, ya que según las predicciones no posee péptido señal. Además, al igual que Tel7 presentaba un dominio α/β hidrolasa-6 (Tabla 29).

Tabla 29. Análisis bioinformático de Tel9

BlastP/ InterProScan/ MyHits			Péptido señal y localización celular		
Proteína	Superfamilia	Multi-dominios	Lipo P*	Signal P*	PSORTb
Tel9	Familia V lipasa/esterasa	<ul style="list-style-type: none"> α/β hidrolasa-6 Pimeloil-ACP metil éster carboxilesterasa 	No	No	Citoplasmática



3. CAPÍTULO 1

3.4. DISCUSIÓN



3.4. Discusión

3.4.1. Selección y caracterización de cepas productoras de Biodiésel

Las estrategias seleccionadas en este primer capítulo estuvieron enfocadas a uno de los objetivos principales de esta Tesis, que fue la búsqueda de microorganismos productores de Biodiésel, con el fin de contribuir al desarrollo de fuentes de energías alternativas al petróleo.

El hecho de haber elegido una almazara como lugar de muestreo se debe a que es el lugar donde se procesan las aceitunas para la producción de aceite de oliva, por lo que se entiende que los residuos del proceso contienen aceites vegetales y los organismos que habiten en ellos estarían adaptados a estos sustratos lipídicos.

Tras el análisis conjunto de los resultados de la composición de las muestras y del aislamiento de organismos lipolíticos, se pudo comprobar que la muestra AEA fue de la que se recuperó el menor número de bacterias lipolíticas. Esta muestra se obtuvo del alpechín, que se corresponde con los residuos acuosos tóxicos del procesado de las aceitunas durante la producción de aceite. El análisis de esta muestra confirmó lo que se sabía de estudios previos, donde se describe que el alpechín es ligeramente ácido y rico en compuestos orgánicos solubles (Alburquerque y col., 2006; de la Fuente y col., 2008). AEA era la muestra que contenía la mayor cantidad de materia orgánica, aunque se conoce que la lignina representa un 50% del total de esta materia orgánica en este tipo de muestra. Al ser la lignina un polímero recalcitrante podría afectar negativamente a la actividad microbiana y a la supervivencia. De hecho, el efecto fitotóxico y antimicrobiano de los fenoles, ácidos orgánicos y ácidos grasos, presentes normalmente en este residuo líquido (alpechín) ya ha sido observado anteriormente (Alburquerque y col., 2004). Esto explicaría el bajo número de microorganismos lipolíticos recuperados de esta muestra.

En total se aislaron en el primer paso de selección 1.016 microorganismos lipolíticos, con representación tanto de organismos procariotas (bacterias) como de organismos eucariotas (hongos y levaduras), lo que nos indica que la zona de muestreo seleccionada para la búsqueda fue acertada, ya que además del gran número de cepas aisladas existe una amplia representación de distintos tipos de microorganismos.

En el segundo paso de selección se empleó un método basado en la transesterificación del *p*-nitrofenolpalmitato (*p*-NPP). Con el fin de seleccionar solo enzimas extracelulares, esta segunda selección se desarrolló usando solo el sobrenadante de las bacterias seleccionadas en el primer paso, ya que se ha descrito que a nivel industrial las mayores producciones se obtuvieron con lipasas extracelulares en vez de con células completas (Ranganathan y col., 2008; Robles-Medina y col., 2009). De hecho, los procedimientos de transesterificación con células completas producen bajos rendimientos de conversión de sustratos debido a la toxicidad del disolvente sobre la célula, y a la baja tasa de transferencia másica de sustratos de alto peso molecular (aceite) del disolvente a la célula (Bajaj y col., 2010). Otra diferencia notable cuando se desarrolla la transesterificación con la célula completa, es el tiempo de reacción. La lipasa Novozym 435 mostró rendimientos de producción del 87% tras 3,5 h de reacción. Sin embargo, para obtener rendimientos del 80-90% de producción de Biodiésel usando células completas, se requirieron tiempos de reacción de 70 h (Ribeiro y col., 2011).

Por otra parte, el método se diseñó con el fin de desarrollar un proceso de selección rápido y sencillo de bacterias capaces de producir Biodiésel, por lo que se intentó simplificar y acortar cada paso. Siguiendo esta línea de trabajo, se realizaron sólo controles negativos al azar, sin realizar el control negativo de cada cepa. Se consideraron positivas las cepas que sobrepasaron al valor más alto de absorbancia a 410 nm en el ensayo de transesterificación (0,8), pero solo se seleccionaron las que presentaron una absorbancia de 1 o mayor, para asegurarnos que elegimos las mejores para el último paso. De este modo, el método se optimizó para conseguir una selección rápida y eficiente en tres pasos, con la que fuimos capaces de seleccionar 5 bacterias con alto rendimiento en producción de FAEs (>80%) de entre un total de 1.016 microorganismos lipolíticos.

En nuestro caso, las enzimas de los sobrenadantes seleccionados para el análisis cromatográfico llevan a cabo una etanólisis 1,3 selectiva del aceite de girasol, lo que produce una transesterificación parcial del aceite que generaría 1 mol de MG por cada 2 moles de FAEE (Luna y col., 2013) y conversiones de hasta el 100%. Así, esto supone una ventaja desde una perspectiva industrial ya que el producto no requerirá procesamientos posteriores para la separación del glicerol contaminante, estando el glicerol integrado en la mezcla final como MG.

El análisis químico también sugirió que esta metodología no era apta para la producción de Biodiésel convencional según la norma EN 14214, pero si lo era para la producción de un nuevo tipo de Biodiésel, el cual incorporaría el glicerol en su composición (Luna y col., 2013; Verdugo y col., 2010). Además, los extractos utilizados en la producción de Biodiésel mostraron, en los ensayos de cinética y reutilización, que con 1 h de reacción era suficiente para alcanzar la máxima producción de Biodiésel, pudiéndose utilizar estos extractos como mínimo 5 veces. Así, concluimos que las principales ventajas de la metodología utilizada serían:

1. La simplificación del procesamiento del Biodiésel producido gracias a la integración del glicerol en el mismo
2. La proporción etanol:aceite (6:1) utilizada en la reacción
3. La baja temperatura de reacción (37°C)

Estas condiciones de reacción junto a resultados de conversiones tan elevados no se han conseguido ni en los últimos y más efectivos intentos de catálisis heterogénea química (Tabla 30) (Yang y col., 2012), ni con otras lipasas probadas (Tabla 31) (Aransiola y col., 2014). Así mientras que para obtener rendimientos cercanos al 100% con catalizadores básicos como el silicato de sodio se requerían temperaturas de reacción de 60°C y al menos 1 h de reacción, y con las lipasas de *Pseudomonas* o de *Candida*, temperaturas de 45°C y al menos 8 h de reacción, en el caso del sobrenadante de *Terribacillus* sp. AE2B 122, se pudieron obtener rendimientos del 100% a 37°C y en tan solo 1 hora de reacción, lo cual supone una ventaja enorme a la hora de reducir costes industriales. Además, en nuestro caso, se utilizó el sobrenadante completo sin necesidad de purificar la proteína. Lo cual supone una ventaja adicional a la hora de reducir costes.

Tabla 30. Catalizadores sólidos básicos más utilizados en la transesterificación de aceites

Catalizador	Materia prima	Condiciones óptimas de reacción	Producción (%FAME)
CaO de cáscara de huevo	Aceite de palma	T ^a = 65°C, t = 2 h Metanol/aceite = 12:1 Cantidad de catalizador = 1.5%	98
KF/CaO	Aceite del árbol del sebo chino	T ^a = 65°C, t = 2.5 h Metanol/aceite = 12:1 Cantidad de catalizador = 4%	96,8
KNO ₃ /CaO	Aceite de colza	T ^a = 65°C, t = 3 h Metanol/aceite = 6:1 Cantidad de catalizador = 1%	98
CaO/Al ₂ O ₃	Aceite de palma	T ^a = 64.29°C, t = 5 h Metanol/aceite = 12.14:1 Cantidad de catalizador = 5.97 %	98,64
KOH/MgO	Grasa de cordero	T ^a = 65°C, t = 20 min Metanol/aceite = 22:1 Cantidad de catalizador = 4%	>98
Dolomita	Aceite de palma kernel	T ^a = 60°C, t = 3 h Metanol/aceite = 30:1 Cantidad de catalizador = 6%	98
Hidrotalcita con KF/Ca-Al	Aceite de palma	T ^a = 65°C, t = 5 h Metanol/aceite = 12:1 Cantidad de catalizador = 5%	97,98
Silicato de sodio	Aceite de soja	T ^a = 60°C, t = 1 h Metanol/aceite = 7.5:1 Cantidad de catalizador = 3%	≈100

La cantidad de catalizador está expresada en % de peso

Tabla 31. Comparativa de la transesterificación enzimática del aceite de *Jatropha curcas*^a y del aceite de girasol^b mediante distintas enzimas

Lipasa	Tiempo (h)	T ^a de reacción (°C)	Ratio molar metanol:aceite	Conversión (%)	Comentarios
^a <i>Pseudomonas cepacia</i> en Celita	8	50	4:1	98	Adición de 50 g/Kg de agua
^a <i>Candida antarctica</i> lipasa B (Novozym 435)	24	45	5:1	98	Una mezcla de 25% de pentanol y 75% de iso-octano se usó como disolvente
^a <i>Thermomyces lanuginosus</i> (Lipozima)	24	45	5:1	77	Sin disolvente
^a <i>Rhizomucor miehei</i> (Lipozima RMIM)	24	45	5:1	78	Sin disolvente
^a <i>Enterobacter aurogenes</i> en sílica activa 48 55 4:1 68 t	48	55	4:1	68	Se usó como disolvente el <i>t</i> -Butanol
^a <i>Rhizopus oryzae</i> en espuma de poliuretano	60	30	3:1	80	Sin disolvente
^b <i>Terribacillus</i> sp. AE2B 122	1	37	6:1	93,2	Sin disolvente
^b <i>Terribacillus</i> sp. AE1B 21	1	37	6:1	100	Sin disolvente

Tabla modificada de Aransiola y colaboradores, 2014

Con respecto a la reutilización del extracto enzimático, habría que realizar un estudio más detallado, incluso probar a inmovilizarlo, ya que tanto para lipasas, como para catalizadores químicos de origen natural se ha descrito la reutilización del catalizador/enzima un mayor número de veces. En el caso de la lipasa Novozym 435, se ha conseguido reciclar la enzima hasta 100 veces usando el acetato de metilo como aceptor acilo (Du y col., 2004) y en el caso de catalizadores químicos de fuentes naturales y renovables, se han llegado a reutilizar hasta 50 veces, usando un catalizador sólido creado por la carbonización incompleta de carbohidratos y posterior sulfatación de éstos (Aransiola y col., 2014).

En el análisis de las viscosidades se observó que todos los sobrenadantes procesados produjeron un Biodiésel con una viscosidad menor al Biodiésel que producían los sobrenadantes sin procesar, siendo además, de unas tres veces menor que la viscosidad del aceite de girasol (34,5 cSt). Debido a la importancia de la viscosidad para el posible empleo del Biodiésel en los motores Diésel es importante que la viscosidad del Biofuel producido por estos sobrenadantes procesados no solo sea menor que el aceite de girasol, sino que tiene que estar en un rango de 3,5 a 5 cSt a 40°C para el Biodiésel convencional según la norma EN 14214. Los mejores valores de viscosidad obtenidos del análisis del Biodiésel, producido por los sobrenadantes procesados, estuvieron entre 9 y 11 cSt, valores que son aproximadamente el doble del valor máximo permitido. Por tanto, este Biodiésel no puede ser usado directamente en los motores Diésel debido a sus valores de viscosidad, aún cuando estos son mucho menores que los del aceite de partida. Sin embargo, al igual que se realiza para el Biodiésel convencional, se podría utilizar este Biodiésel como mezcla volumétrica con el Diésel convencional (Yusuf y col., 2011). Según la Agencia Andaluza de la Energía, el uso de estas mezclas volumétricas implica un ahorro energético y una disminución de las emisiones de CO₂ de los vehículos que las utilizan.

Las cepas que mostraron el mayor rendimiento en la producción de Biodiésel (%FAE por encima del 60%) fueron 14 cepas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Bacillus* y *Terribacillus* (Tablas 21 y 22).

Las especies bacterianas filogenéticamente más cercanas fueron:

Pseudomonas veronii (AE2B 30, AE2B 29, AE2B 222) descrita por primera vez por Elomari y col. (1996). Los miembros de esta especie crecen en α -aminobutirato, sacarosa, butirato, isobutirato, eritritol, L-triptófano y trigonelina como única fuente de carbono. El contenido medio en G+C de la especie tipo CFML 92-134^T (CIP 104663^T) es de 61 mol%.

Pseudomonas extremaustralis (AE2B 130, AE2B 261) fue aislada por primera vez por Lopez y col. (2009) de una laguna temporal en la Antártida. Esta bacteria es arginina dihidrolasa y nitrato reductasa positiva y crece entre 4 y 37°C. La cepa 14-3^T representa la especie tipo (DSM 17835^T y CIP 109839^T).

Acinetobacter lwoffii (AEDH 145) fue descrita por primera vez por Brisou & Prevot (1954). Esta especie utiliza azelato y DL-lactato como única fuente de carbono, y el contenido G+C del ADN es de 46 mol%. La especie tipo es CIP 64.10^T (= ATCC 15309T), la cual utiliza acetato de fenilo, D-malato y etanol como fuente de carbono (Bouvet & Grimont, 1986).

Enterobacter ludwigii (AE1B 89 y AE1B 92) fue descrita por Hoffmann y col. (2005) a partir de muestras clínicas. Esta especie pertenece a bacterias Gram-negativas, fermentativas y se diferencia del resto de especies de este género por su crecimiento en mioinositol y 3-O-metil-D-glucopiranososa. La especie tipo es EN-119 (=DSM 16688^T=CIP 108491^T).

Bacillus simplex (Meyer & Gottheil, 1901) y *Bacillus muralis* (Heyrman y col., 2005) (AE1B 26 y AE1B 35). La especie *Bacillus simplex* se caracteriza por agrupar bacterias móviles cuando crecen individualmente, pero no cuando crecen en cadenas y por la formación de endosporas. La mayoría de las cepas son aerobias estrictas, crecen entre 20 y 30°C, hidrolizan almidón, son catalasa positivas, reducen el nitrato a nitrito, producen ácido a partir de fructosa, N-acetilglucosamina, glucosa, inulina, trealosa y sacarosa. La especie tipo es NRS 960^T (=ATCC 49097^T=DSM 1321^T=LMG 11160^T) (Heyrman y col., 2005). Las células de la especie *Bacillus muralis* son móviles cuando crecen individualmente, forman endosporas y la temperatura óptima de crecimiento es de 30°C. Hidrolizan almidón, son catalasa y oxidasa positivas, reducen nitrato a nitrito, hidrolizan aesculina, producen ácido a partir de L-arabinosa, arbutina, celobiosa, fructosa, galactosa, N-acetilglucosamina, glucosa, glicerol, lactosa, maltosa, manitol, manosa, melobiosa, rafinosa, ribosa, trealosa y salicina. Los ácidos grasos mayoritarios son anteiso-C_{15:0} y iso-C_{15:0} y la especie tipo es LMG 20238^T (=DSM 16288^T) (Heyrman y col., 2005).

Aeromonas hydrophila (Stanier, 1943) y *A. media* (Allen y col., 1983)(AE1B 22 y AE1B 20). Las cepas pertenecientes a la especie *A. hydrophila* son móviles y se dividen en dos biovars. Las cepas del primer biovar son butanodiol deshidrogenasa positivas y producen gas y acetoína a partir de glucosa. Sin embargo, las cepas del segundo biovar no producen gas ni acetoína a partir de glucosa y son anaerogénicas. La especie tipo es *A. hydrophila* ATCC 7966 (Popoff & Veron, 1976). Los organismos pertenecientes a la especie *A. media* son bacterias no móviles que reducen nitrato,

crecen en un rango de temperatura entre 4 y 37°C, son β -galactosidasa, oxidasa, catalasa y arginina dihidrolasa positivas, son capaces de degradar gelatina, almidón, ácido ribonucleico, Tween 20, Tween 40, Tween 60 y Tween 80, y tienen como especie tipo la cepa ATCC 33907^T (Allen y col., 1983).

Terribacillus goriensis (Krishnamurthi & Chakrabarti, 2008) y *Terribacillus saccharophilus* (An y col., 2007) (AE1B 21 y AE2B 122). Las cepas de la especie *T. goriensis* producen esporas helicoidales, crecen en un rango de temperatura entre 15-43°C, hidrolizan caseína, Tween 40, Tween 60, Tween 80 y almidón, son catalasa, DNAsa positivas, hidrolizan aesculina, gelatina y PNPG, el contenido G+C es de 43 mol% y la especie tipo es CL-GR16^T (=KCCM 42329^T=DSM 18252^T) (Kim y col., 2007). La especie *T. saccharophilus* crece en un rango de temperaturas entre 5-45°C, es catalasa positiva, y el contenido G+C de la especie tipo 002-048^T (=IAM 15309^T=KCTC 13936^T) es de 44 mol%.

Para los análisis genéticos y proteómicos, se seleccionó la cepa AE2B 122, la cual junto a AE1B 21, fueron las mejores en los ensayos de producción de Biodiésel.

Basados en el análisis del ARN 16S, ambas cepas compartían un 99,8% de similitud con los organismos más cercanos filigenéticamente *Terribacillus goriensis* y *Terribacillus saccharophilus*, por lo que se nombraron como *Terribacillus* sp. AE2B 122 y *Terribacillus* sp. AE1B 21.

Varias de las cepas mencionadas pertenecen a géneros que ya han sido caracterizados por mostrar actividad transesterificadora, ejemplos son los géneros *Pseudomonas*, *Enterobacter* y *Bacillus*. Otros microorganismos que han sido descritos por tener enzimas con actividad transesterificadora son *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas cepacia*, *Rhizomucor miehei*, *Rhizopus oryzae*, *Candida rugosa*, *Thermomyces lanuginosus*, *Candida antartica*, *Chromobacterium viscosum*, *Burkholderia cepacia*, *Enterobacter aerogenes*, *Mucor miehei*, *Penicillium expansum* y *Bacillus subtilis* (Aransiola y col., 2014; Bajaj y col., 2010). Es interesante remarcar que las cepas AE2B 122 y AE2B 21, las cuales mostraron los dos mejores resultados en la producción de Biodiésel bajo nuestras condiciones experimentales, pertenecen al género *Terribacillus*.

Hasta donde nuestro conocimiento alcanza, no hay evidencias anteriores sobre el empleo de miembros del género *Terribacillus* en reacciones de transesterificación, y por tanto, constituye un nuevo género productor de enzimas para la síntesis de Biodiésel.

Con respecto a las actividades hidrolíticas se observó que la mayoría de las cepas relacionadas con el género *Pseudomonas* no presentaban actividad xilanasa ni pululanasa, y solo algunas de las cepas relacionadas con *P. veronii* y *P. stutzeri* presentaron actividad proteasa o combinación de las actividades ADNasa/amilasa o pululanasa/amilasa, actividades que ya habían sido descritas para algunos miembros de este género (Chattopadhyay y col., 2014), además de encontrarse también algún caso de cepas con actividad xilanasa, como *Pseudomonas migulae* (Tomova y col., 2014). Las cepas emparentadas con los géneros *Acinetobacter*, *Enterobacter* y *Terribacillus* no presentaron ninguna de las actividades hidrolíticas ensayadas, aunque en la bibliografía si se han encontrado ejemplos de cada uno de estos géneros que presentan algunas de las actividades estudiadas, como por ejemplo actividad amilasa en *Acinetobacter* (Sugita y col., 1997), actividad proteasa para algunas especies de *Enterobacter* (Tomova y col., 2013) o actividad amilasa para *Terribacillus goriensis* (Kim y col., 2007). Las cepas más cercanas filogenéticamente al género *Aeromonas* son las que presentaron un mayor número de actividades hidrolíticas (ADNasa, Pululanasa, Amilasa y Proteasa). Todas estas actividades hidrolíticas ya han sido descritas para este género, además de ejemplos de especies con actividad xilanasa (*A. caviae*) (Hope & Dean, 1974; Pemberton y col., 1997). Por último, las cepas asignadas al género *Bacillus* presentaron la mayoría actividad ADNasa, menos la cepa relacionada con *Bacillus muralis*, que además de esta actividad presentó actividad proteasa. También se han descrito en este género otras de las actividades probadas, pullulanasa, proteasa y xilanasa en distintos artículos (Haki & Rakshit, 2003; Kamble y col., 2010; Pandey y col., 1999).

3.4.2. Identificación de las proteínas responsables de la actividad transesterificadora de *Terribacillus* sp. AE2B 122. Análisis genéticos

Para la identificación de las proteína/s responsable/s de la actividad transesterificadora, se siguieron distintas estrategias, utilizando los datos obtenidos a partir de la secuenciación y análisis informático del genoma de *Terribacillus* sp. AE2B 122.

Las estrategias utilizadas fueron:

- Análisis del secretoma.
- PCR a tiempo real (RT) de las lipasas/esterasas candidatas.
- Ensayos de producción *in vitro* de las lipasas candidatas y comprobación de su actividad transesterificadora.
- Sobreexpresión de las lipasas candidatas en *E. coli* BIVU111.
- Purificación a partir del propio organismo de la proteína responsable.

Actualmente no se encuentran disponibles en las bases de datos públicas los genomas de *T. goriensis* y *T. saccharophilus*, por lo que no se han podido comparar los resultados de la secuenciación del genoma de *Terribacillus* sp. AE2B 122 con sus dos organismos más cercanos filogenéticamente, pero si con *Ornithinibacillus* sp. TW25 (taxonomía: Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; *Ornithinibacillus*; *Ornithinibacillus scapharcae*) (Genome, NCBI) y *Terribacillus aidingensis* MP602 (taxonomía: Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; *Terribacillus*; *Terribacillus aidingensis*) (Genome, NCBI) (Tabla 32).

Terribacillus aidingensis cepa MP602 presenta un 97,2% y un 95,5% de similitud del ARNr 16S con *T. saccharophilus* RB589 y *T. goriensis* CL-GR16T, respectivamente (Liu y col., 2010). En la Tabla 32 se encuentran los datos comparativos entre los principales valores obtenidos del análisis de los genomas de *Terribacillus* sp. AE2B 122, *Ornithinibacillus* sp. TW25 y *Terribacillus aidingensis* MP602.

En esta comparación se aprecia un gran parecido en el tamaño del genoma de los tres organismos, al igual que en el número de genes y proteínas. El contenido en G+C es similar también, sobre todo entre *Terribacillus* sp. AE2B 122 y *Terribacillus aidingensis* sp. MP602.

Tabla 32. Comparación estadística de los genomas de *Terribacillus* sp. AE2B 122, *Ornithinibacillus* sp. cepa TW25 y *Terribacillus aidingensis* MP602

Características	<i>Terribacillus</i> sp. AE2B	<i>Ornithinibacillus</i> sp.	<i>Terribacillus aidingensis</i> sp.
Genoma	122	TW25	MP602
Tamaño (Mb)	3,72	3,84	3,58
GC %	42,9	36,7	42,8
Genes	3.811	3.674	3.332
Proteínas	3.768	3.467	3.230
ARNt	39	54	56
ARNr	3	4	24
Otros ARN	1	2	1

En la predicción existen 51 genes de virulencia, enfermedad y defensa en el genoma de *Ornithinibacillus* sp. TW25, mientras que en *Terribacillus* sp. AE2B 122 existen 55 de estos genes. El genoma de *Ornithinibacillus* sp. TW25 también contiene genes involucrados en la hidrólisis de la bilis, resistencia a vancomicina y bombas de transporte que aportan resistencia a multidroga (Whon y col., 2011), a diferencia de en *Terribacillus* sp. AE2B 122, donde no se han encontrado estos genes, pero si genes de resistencia a antibióticos (metilina, bleomicina, cloranfenicol y fosfomicina).

Con el objetivo de identificar la(s) esterasa(s)/lipasa(s) del sobrenadante de *Terribacillus* sp. AE2B 122 responsables de la actividad transesterificadora se siguieron 3 estrategias independientes.

Se llevó a cabo un estudio de expresión de los genes candidatos mediante RT-qPCR, con objeto de identificar aquellos genes que presentaran el mismo patrón de expresión que la actividad enzimática detectada en el sobrenadante de *Terribacillus* sp. AE2B 122. El valor máximo de actividad de el sobrenadante se detectó a las 72 h, lo que podría indicar una regulación de la expresión del gen candidato por el crecimiento de la bacteria, activándose en fase estacionaria, o una necesidad de acumulación de proteína en el sobrenadante a lo largo del crecimiento. Sin embargo, los perfiles de expresión de los genes candidatos (Figura 26) no coincidieron con los perfiles de actividad del sobrenadante de *Terribacillus* sp. AE2B 122 (Figura 22), por lo que no permitió la identificación del gen responsable de la actividad transesterificadora. Esto puede deberse a que ninguno de los genes candidatos es el responsable de esta actividad o a que la actividad transesterificadora observada en el sobrenadante de *Terribacillus* sp. AE2B 122 sea el resultado de la actividad conjunta de varios de estos genes. También se analizó en paralelo el secretoma de *Terribacillus* sp. AE2B 122 crecido en las condiciones óptimas para detectar actividad transesterificadora, pero no se detectó ninguna de las lipasas candidatas, de hecho se detectaron una gran cantidad de proteínas, mucha de ellas intracelulares, lo que podría estar enmascarando una pequeña fracción de alguna de las lipasas responsables de la actividad.

Es interesante destacar que la proteína responsable de la actividad transesterificadora detectada no se encuentra regulada por la presencia de tributirina en el medio, ya que se obtuvieron valores de actividad similares, e incluso mayores, sin la adición de este sustrato al medio, tanto en los ensayos de optimización de la actividad transesterificadora con pNPP, como en los ensayos de producción de Biodiésel con aceite de girasol. Esto puede deberse a una inhibición del crecimiento de *Terribacillus* sp. AE2B 122, o a una inhibición de la actividad transesterificadora debido a una acción contaminante de las trazas de tributirina que puedan permanecer en las fracciones utilizadas en las reacciones posteriores.

Otras estrategias utilizadas fueron la expresión *in vitro* de las proteínas candidatas y la sobreexpresión de sus genes en *E. coli* BIVU111. Las actividades detectadas con la solución de las distintas proteínas sintetizadas *in vitro* no alcanzaron los valores esperados y en la mayoría de los casos fueron iguales o inferiores a los controles negativos utilizados en el ensayo (Figuras 27 y 28) .

En el caso de la sobreexpresión de las lipasas candidatas en *E. coli* BIVU111, los ensayos de hidrólisis del MUF-butirato en placa multipocillo mostraron 5 lipasas con actividad (Tel2, Tel3, Tel4, Tel7 y Tel8), siendo Tel3 y Tel8 las más destacadas, aunque hay que tener en cuenta que en estos ensayos la actividad no está normalizada a ningún valor y la medida de la misma es solo cualitativa. En el caso de los ensayos con el sustrato *p*-NPP, realizados con las mismas fracciones celulares, se observó que los valores más altos los presentaban las enzimas candidatas Tel2 y Tel7, tanto de actividad total como específica, igualando el valor del sobrenadante de *Terribacillus* sp. AE2B 122, lo que puede explicarse por una preferencia de Tel2 y Tel7 por ambos sustratos, butirato (C4:0) y palmitato (C16:0), y una preferencia de Tel3, Tel4 y Tel8 solo por el butirato.

En los ensayos de transesterificación con *p*-NPP, Tel2 no mostró resultados destacables, siendo solo la lipasa Tel7 la que mejores resultados presentó, sin llegar a igualar o superar el valor de actividad del sobrenadante de *Terribacillus* sp. AE2B 122. Una explicación a este hecho podría ser que la cantidad de proteína producida no fuera suficiente para poder alcanzar la actividad transesterificadora del sobrenadante de *Terribacillus* sp. AE2B 122, ya que como se aprecia en los geles de proteínas (Figura 29 y 30), Tel7 es la proteína que menos se expresa, sin llegar a apreciarse una banda clara del tamaño esperado en ninguna de las fracciones celulares. Por tanto, Tel7 es una buena candidata para estudios posteriores, aunque no sea claro que ésta sea la responsable de la actividad en el sobrenadante de *Terribacillus* sp. AE2B 122.

Una explicación a la falta de actividad tanto en los ensayos de síntesis *in vitro* de las proteínas como en la sobreexpresión de sus genes en *E. coli* BIVU111, sería el hecho de que las lipasas se expresaran generando enzimas insolubles o no funcionales debido a un mal plegamiento, quedando atrapadas en cuerpos de inclusión (Sorensen & Mortensen, 2005). Otra posibilidad es que las proteínas necesiten sufrir algún tipo modificación post-traduccional para ser funcionales. Esta modificación no se llevaría a cabo en *E.coli* BIVU111, ya que la maquinaria de procesamiento de proteínas es específica en los distintos microorganismos.

A pesar de la idea preestablecida de que las bacterias no poseen mecanismos de modificaciones post-traduccionales (Overton, 2014), en trabajos recientes se ha comprobado que los procariotas son capaces de modificar las proteínas mediante fosforilación, lo que les permite responder a estímulos externos más rápidamente, afectando también a la función y la actividad de la proteína fosforilada. Otros ejemplos de modificaciones postraduccionales, recientemente descritos gracias a la espectrometría de masas, son acetilación, metilación, carboxilación, proteólisis, glicosilación, lipidación, nitrosilación, adición de formas de fósforo (fosfoetanolamina, fosfocolina y fosfoglicerol), adenilación, pupilación, ribosilación y desaminación.

Estas modificaciones intervienen, por ejemplo, en la respuesta a estrés, regulación del metabolismo, regulación de la transcripción, quimiotaxis, virulencia, estabilidad proteica, función y localización subcelular (Cain y col., 2014).

En el caso de los genes candidatos que se han analizado, los sitios de modificaciones postraduccionales identificados mediante el programa PROSITE fueron los siguientes:

-Para los genes *te1*, *te2* y *te3* solo se encontraron sitios de N-glicosilación.

-Para *te4*, *te5*, *te6*, *te7* y *te8* se encontraron sitios de N-glicosilación, N-miristoilación y fosforilación. En el caso de *te5* también se encontró un sitio de amidación.

En varios trabajos publicados se ha observado reducción de la actividad de ciertas enzimas de mamíferos, debido a mutaciones en sitios de N-glicosilación que pueden provocar plegamientos incorrectos (Branza-Nichita y col., 2000; Nagai y col., 1997). En bacterias, la primera evidencia de regulación de la actividad enzimática por glicosilación se descubrió en una hidrolasa del peptidoglicano (Rolain y col., 2013). También se ha descrito el efecto regulador de la fosforilación en la síntesis proteica, expresión génica y en la síntesis de la membrana celular de procariotas (Dworkin, 2015).

Debido a que las estrategias genéticas no fueron concluyentes, diseñamos una estrategia bioquímica para la purificación de las proteínas a partir del sobrenadante de *Terribacillus* sp. AE2B 122. Para esta purificación se han utilizado diferentes columnas de cromatografía. Tras los pasos de purificación de CIH y CEA, la actividad total de las fracciones, comparada con la actividad total inicial del sobrenadante *Terribacillus* sp. AE2B 122, disminuyó y la actividad específica aumentó, lo que era de esperar ya que se va perdiendo proteína a lo largo de los pasos de purificación, debido a que una parte de la proteína buscada puede no quedar pegada a la matriz de la columna, o que no se recupere toda la proteína de la matriz en el momento de la elución (Li y col., 2013; McCue, 2009).

A pesar de detectar actividad transesterificadora en las fracciones, no se pudo determinar que enzimas eran las responsables de estas zonas de actividad tras los análisis de las bandas de proteínas de los geles. Las bandas analizadas resultaron contener proteínas cuyos homólogos no tenían ninguna relación con lipasas ni esterases. Aunque estas fracciones presentaban actividad transesterificadora usando el sustrato *p*-NPP, no se detectó esta actividad al utilizar aceite de girasol en la reacción de transesterificación, no apreciándose producción de Biodiésel tras los análisis de CG. Esto puede deberse a que la enzima presente en estas fracciones sea capaz de transesterificar el *p*NPP, pero no el aceite de girasol, ya que puede ser más fácil de llevar a cabo la reacción con este primer sustrato. Además, la cantidad de aceite de girasol utilizado en el ensayo es de unas 500 a 1000 veces mayor que la cantidad de *p*NPP utilizado.

En la repetición de la separación por CIH para su análisis mediante zimograma con el sustrato MUF-butirato, se comprobó que en el sobrenadante de *Terribacillus* sp. AE2B 122 existía una proteína capaz de hidrolizar este sustrato. Esta proteína no permanecía unida a la matriz de la columna de CIH, por lo que se perdía en los primeros pasos de inyección de la muestra y lavado de la columna con TPK+SA, antes del comienzo de la separación por gradiente hidrofóbico. Esto probablemente se debió a que el grado de hidrofobicidad utilizado fue demasiado bajo para poder retener esta proteína, ya sea debido a la matriz seleccionada (Fenil Sefarosa), a la concentración de sulfato de amonio utilizado o al pH del tampón TPK+SA de inicio de la separación (10% SA, pH 7).

La banda proteica con actividad hidrolítica detectada en los zimogramas de MUF-butirato se analizó mediante la búsqueda combinada con MASCOT, tanto de la huella peptídica como de los péptidos fragmentados, comparando los datos con la base de datos NCBI y el genoma de *Terribacillus* sp. AE2B 122. Estos análisis revelaron la presencia de dos proteínas mayoritarias, una de las cuales resultó ser una α/β hidrolasa-6 de la superfamilia de lipasas/esterasas (Tel9). Esta lipasa/esterasa había pasado desapercibida debido a que en la secuenciación del genoma se anotó como una proteína hipotética. Tras su detección en los zimogramas se ha conseguido localizar también esta enzima en el secretoma de *Terribacillus* sp. AE2B 122, donde también se anotó inicialmente como proteína hipotética.

Esta α/β hidrolasa sería una buena candidata para la evaluación de su actividad hidrolítica y transesterificadora sobre *p*NPP y aceite de girasol tras su sobreexpresión en *E. coli* BIVU111, ya que es la única lipasa/esterasa localizada en el sobrenadante de *Terribacillus* sp. AE2B 122.

El hecho de encontrar Tel9 en el sobrenadante, cuando la predicción bioinformática de esta proteína la clasificó como proteína citoplasmática, puede deberse a la lisis celular sufrida por *Terribacillus* sp. AE2B 122. Esta lisis se demostró en los resultados del análisis del secretoma, donde muchas de las proteínas eran intracelulares. La lisis celular era más evidente en el medio de cultivo LB, como ya se comprobó en los ensayos de optimización de la actividad, sospechándose que pudiera ser debida a fagos presentes en el genoma de *Terribacillus* sp. AE2B 122 (fago *Paenibacillus* philBB_PI23, virus de ADN de doble cadena, sin fase de ARN; Caudovirales; Siphoviridae) o *quorum sensing*. Para comprobar si la lisis se debía a la actividad de fagos, se hicieron pruebas con varios quelantes de cationes, que son necesarios para la replicación de los fagos (EDTA y EGTA), ninguno de los cuales fueron capaces de impedir la lisis, lo cual sugiere que ésta podría producirse por un fenómeno de *quorum sensing*.

Teniendo en cuenta la localización citoplasmática de Tel9, según el análisis bioinformático, y suponiendo que esta enzima sea la responsable de la actividad transesterificadora de *Terribacillus* sp. AE2B 122, sería de esperar que en los ensayos de optimización de la actividad transesterificadora con *p*NPP la fracción intracelular mostrara los mayores valores. Sin embargo, es en la fracción extracelular donde se

observan los mejores resultados en las reacciones de transesterificación, pudiendo deberse a una acción conjunta de Tel9, tras su liberación al sobrenadante debido a la lisis celular, y de Tel7, que fue la única de las lipasas/esterasas candidatas clasificada como proteína extracelular en los análisis bioinformáticos y la única que ha mostrado tener actividad transesterificadora sobre pNPP en los ensayos de sobreexpresión en *E. coli* BIVU111. Una segunda hipótesis sería que la proteína responsable de la actividad transesterificadora fuera únicamente Tel7 y el problema para su detección haya sido su baja expresión en los ensayos realizados. El no haber detectado Tel7 en el sobrenadante de *Terribacillus* sp. AE2B 122 puede deberse también a la lisis celular, la cual libera una gran cantidad de proteínas intracelulares que pueden estar enmascarando una pequeña cantidad de Tel7, teniendo además en cuenta que no se ha conseguido una expresión óptima en *E. coli* de esta proteína.

Por tanto, proponemos a Tel7 y/o Tel9 como las posibles enzimas responsables de la formación de Biodiésel por el sobrenadante de *Terribacillus* sp. AE2B 122. Para ello, se requieren estudios adicionales como mejorar las condiciones de expresión de Tel7 y Tel9, para poder obtener cantidades suficientes de enzimas y realizar los ensayos de Biodiésel con aceite de girasol. Es importante subrayar que los sobrenadantes procesados, sin necesidad de purificar la enzima, son capaces de convertir hasta un 100% del aceite de girasol a Biofuel, reduciendo así el coste de la producción del Biofuel, ya que se evita el paso de purificación.



4. CAPÍTULO II

4.1. INTRODUCCIÓN



4. CAPÍTULO II. Resistencia a Metales y Metaloides en *Terribacillus* sp.

AE2B 122

4.1. INTRODUCCIÓN

4.1.1. Género *Terribacillus*

El género *Terribacillus* pertenece al grupo 1 del género *Bacillus* (Ash y col., 1991), junto a otros muchos géneros halotolerantes y halofílicos como *Halobacillus* (Spring y col., 1996), *Virgibacillus* (Heyndrickx y col., 1998), *Gracilibacillus* (Waino y col., 1999), *Oceanobacillus* (Lu y col., 2001), *Filobacillus* (Schlesner y col., 2001), *Lentibacillus* (Yoon y col., 2002), *Paraliobacillus* (Ishikawa y col., 2002), *Tenuibacillus* (Ren & Zhou, 2005b), *Pontibacillus* (Lim y col., 2005), *Salinibacillus* (Ren & Zhou, 2005a), *Thalassobacillus* (Garcia y col., 2005), *Halolactibacillus* (Ishikawa y col., 2005), *Ornithinibacillus* (Mayr y col., 2006) y *Paucisalibacillus* (Nunes y col., 2006). Estas bacterias no crecen o crecen muy débilmente si no se le añade sal al medio de crecimiento, siendo la sal, en la mayoría de los casos, un requerimiento para su crecimiento (Krishnamurthi & Chakrabarti, 2008).

La primera descripción de este género se llevo a cabo por An y colaboradores (2007), al caracterizar cepas bacterianas aisladas de muestras tomadas de suelos japoneses que presentaron una similitud menor del 94,3% en la secuencia del ARNr 16S respecto a los géneros filogenéticamente relacionados. Se trataba de bacilos Gram-positivos, estrictamente aerobios, no móviles, que formaban endosporas subterminales elipsoidales, presentaban como peptidoglicano en la pared celular el ácido meso-diaminopimérico, MK-7 como la menaquinona predominante y anteiso-C15:0 y anteiso-C17 como los ácidos grasos de pared predominantes. Los miembros de este género forman colonias circulares y convexas y pueden ser bacterias móviles o no móviles, son catalasa-positivos, no producen H₂S, ni indoles, no reducen el nitrato a nitrito, pueden producir o no acetoina, no presentan ureasa, pueden poseer actividad β-galactosidasa-positiva o -negativa. El contenido en G+C del ADN es del 43-46%, mientras que el de los géneros más cercanos están en el rango del 36-40%. La especie tipo de este género es *Terribacillus saccharophilus*, la cual presenta una alta similitud de secuencia

del ARNr 16S con *Terribacillus goriensis* (99,8%) y *Terribacillus halophilus* (99,2%) (An y col., 2007; Krishnamurthi & Chakrabarti, 2008).

En el año 2010, Liu y colaboradores describieron una nueva especie de este género, *Terribacillus aidingensis* (Liu y col., 2010). Hasta la actualidad, el genoma de *Terribacillus aidingensis* MP602 es el único genoma de este género secuenciado. Esta cepa de *Terribacillus aidingensis* presenta actividad antifúngica sobre ciertos hongos patógenos, lo que la hace una buena candidata para su uso como biopesticida (GOLD ID Gp0096851). Otra especie de este género que presenta actividad antimicrobiana es *Terribacillus halophilus*, con la producción de quitinasa por la cepa J31 (Essghaier y col., 2014).

Por tanto, este relativamente nuevo género abre nuevas posibilidades para la búsqueda de nuevas enzimas y posibles aplicaciones en biotecnología.

4.1.2. Resistencia a metales

4.1.2.1. Resistencia a arsénico

El arsénico fue uno de los primeros compuestos químicos reconocidos como carcinógeno, aunque el mecanismo responsable de su efecto solo se conoce en parte. Se estima que aproximadamente 40 millones de personas en el mundo tienen riesgo de beber agua contaminada con arsénico. Uno de los principales problemas del arsénico es la dificultad del manejo de los desechos del mismo, ya que éste se presenta en varios estados de oxidación (+V,+III, 0, -III). Además, el arsénico es muy abundante y está distribuido ampliamente por toda la corteza terrestre. Las principales fuentes de arsénico son naturales como manantiales termales, zonas volcánicas y mineras...etc. Pero también podemos encontrar fuentes de arsénico como producto de la actividad humana (minería, industria, pesticidas, agricultura...etc). En la naturaleza el arsénico puede presentarse como arseniato As(V), arsenito As(III), arsénico elemental As(0) y arsenido As(-III). También puede encontrarse en compuestos orgánicos (enlaces C-As), como derivados del arsénico mono-, di- o tri- metilado. Los dos estados de oxidación mayores son los más comunes en la naturaleza, aunque las proporciones de cada uno dependerán de las propiedades físico-químicas y de los microorganismos que habiten la zona (Slyemi & Bonnefoy, 2012).

Algunos organismos pueden utilizar el arsénico como fuente de energía e incluso requerir arsénico para su correcto metabolismo, constituyendo microorganismos con uso potencial en biorremediación (Páez-Espino y col., 2009; Slyemi & Bonnefoy, 2012).

Los procariontes son generalmente 10 veces más resistentes a As(V) que a As(III). En la naturaleza los microorganismos responden a la toxicidad del arsénico de diferentes formas: precipitación, quelación, compartimentalización, extrusión, metilación, reducción para detoxificación o para respiración y oxidación de arsenito (Figura 48) (Slyemi & Bonnefoy, 2012). Cuando el arsénico no juega ningún papel metabólico o nutricional en la célula, los organismos no poseen ningún sistema de captación de arseniato o arsenito, pero el arsénico puede entrar en la célula a través de transportadores de otras especies químicas análogas al mismo. En especial, el arseniato es un oxoanión análogo químicamente al fosfato, por lo que utiliza los transportadores de fosfato (Pit y Pst en bacterias Gram negativas) para entrar en la célula (Figura 48). Por el contrario, el arsenito a pH fisiológico está en la forma no cargada As(OH)_3 , que es parecida estructuralmente al glicerol, por lo que en este caso, las agua-gliceroporinas son los transportadores usados por este estado de oxidación del arsénico (Figura 48). En levaduras, ratas y humanos algunos tipos de sistemas de captación de azúcar pueden también transportar arsenito (Páez-Espino y col., 2009; Slyemi & Bonnefoy, 2012).

El arsenito es más nocivo para la célula que el arseniato, ya que, debido a su afección por los grupos tiol, se une a la cisteína de las enzimas y debido a su capacidad para inducir la generación de especies reactivas de oxígeno, produce daño en proteínas, lípidos y ADN (Tsai y col., 2009). Así, la oxidación del arsenito en la célula se entiende como un proceso de detoxificación, o al menos de reducción de su toxicidad, y se realiza mediante la enzima arsenito oxidasa. El arsenito es mucho más soluble que el arseniato que además, es más fácilmente eliminado por coagulación con Fe(III). Por otro lado, la oxidación del arsenito puede servir como un donador de electrones, como es el caso de bacterias de los géneros *Agrobacterium* y *Rhizobium*, que pueden utilizar arsenito como única fuente de electrones (Páez-Espino y col., 2009).

Recientemente los genes responsables de la oxidación aeróbica del arsenito (*aox*, *aso*, *aro*) se han renombrado con la nomenclatura común *aio* (Escudero y col., 2013).

Con respecto a la reducción de arseniato en bacterias, se han descrito dos tipos: respiración anaeróbica y detoxificación por reducción de arseniato (Figura 48). En el caso de respiración anaeróbica, la bacteria utiliza una reducción desasimilatoria donde el arseniato actúa como aceptor terminal de electrones. El aislamiento de bacterias que respiran arseniato pertenecientes a diferentes grupos filogenéticos (Gram-positivas, β -, γ - y ϵ -proteobacterias y Geobacterias) sugiere que estas bacterias están distribuidas por todos los grupos bacterianos. En los casos estudiados, la enzima responsable de la reducción respiratoria es una enzima de membrana codificada en el operón *arr* que siempre incluye los genes *arrA* y *arrB* (Páez-Espino y col., 2009; Yamamura & Amachi, 2014). Esta reducción de As(V) permite la movilización de As(III) que es más tóxico y más soluble, lo que elevaría la contaminación del ambiente, afectando a la calidad de los suministros de agua (Slyemi & Bonnefoy, 2012). La detoxificación se produce por reducción del arseniato mediante una reductasa citoplasmática, que convierte el arseniato en arsenito, el cual será posteriormente expulsado de la célula por una bomba de arsenito (Páez-Espino y col., 2009; Yamamura & Amachi, 2014).

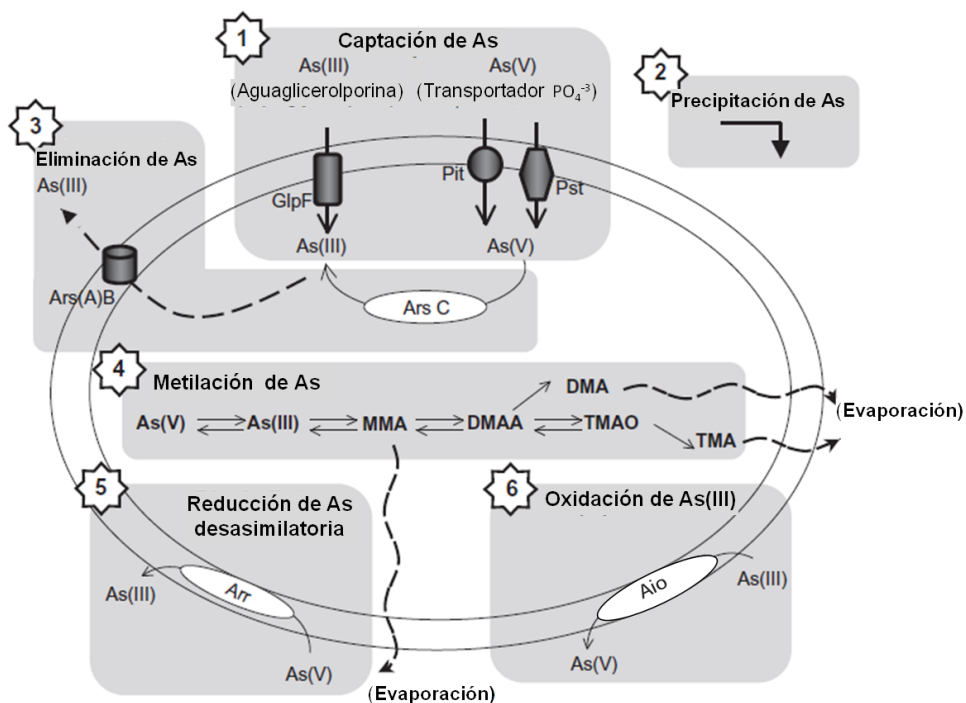


Figura 48. Resumen de los distintos procesos que los procariontes utilizan para el procesamiento del arsénico. 1. El arsénico entra a la célula por agua-glicerolporinas [arsenito (As(III))], o por transportadores de fosfatos [arseniato As(V)]; 2. el arsénico se inmoviliza en el medio por precipitación extracelular; 3. una vez que el As(V) está dentro de la célula éste se reduce a As(III) por una arseniato reductasa, ArsC. El As(III) se expulsa fuera de la célula por la bomba específica de As(III) As(A)B; 4. El arsénico inorgánico pueden transformarse a orgánico a través de una cascada de metilaciones; 5. El As(V) se usa como aceptor de electrones durante la respiración mediante una reductasa desasimilatoria de arseniato ArrAB; 6. El As(III) actúa como donador de electrones mediante la oxidación de As(III) por una oxidasa AioAB. As: arsénico, As(III): arsenito, As(V): arseniato, Pit: transportador de fosfato inorgánico (PO_4^{-3}), Pst: transportador específico de fosfato, GlpF: agua-glicerolporina, ArsC: reductasa de arseniato (destoxificación), Ars(A)B: bomba de eliminación de arsenito, MMA: metilarsenito, DMAA: dimetil arsenito y arseniato, DMA: dimetilarsina, TMAO: óxido trimetil arsina. Figura obtenida de Slyemi y colaboradores (2012)

La resistencia o tolerancia a arsénico de las bacterias que realizan detoxificación por reducción de arseniato, está mediada por el operón *ars*. Los genes que integran este operón están ampliamente distribuidos en la naturaleza y aparecen sistemáticamente co-transcritos en una amplia variedad de configuraciones genéticas dependiendo de la especie. Los genes centrales comprenden al represor transcripcional ArsR, la bomba de expulsión de arsenito ArsB y la arseniato reductasa ArsC (Figura 49).

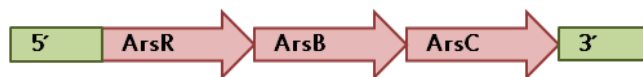


Figura 49. Organización más simple conocida del operón *ars*

Los genes *ars* se han encontrado localizados tanto en el cromosoma como en plásmidos, o en ambos en el mismo organismo. La combinación mínima más común de genes que se ha encontrado es *arsRBC*. Ejemplos de organismos con esta organización génica en sus cromosomas son *E. coli*, *P. fluorescens* MSP3 y *P. aeruginosa*. También se ha detectado esta organización (Figura 49) en los plásmidos pI258 y pSX267 de *Staphylococcus*. Se han descrito otras organizaciones más complejas del operón, como *arsRDABC* que se encuentra en algunos plásmidos de *E. coli* y *Acidophulus multivurum* AIU301. En este operón, ArsA es una ATPasa que aporta energía a la bomba ArsB para la eliminación de arsenito y antimonio, ArsD se ha indentificado como una chaperona de arsénico para la bomba ArsAB que transfiere As(III) y Sb(III) a la subunidad ArsA de la bomba y aumenta la afinidad de ArsA por As(III). Otras especies tienen los genes centrales del operón *ars* en disposiciones diferentes. En *Acidithiobacillus ferroxidans* encontramos dos disposiciones transcripcionales divergentes, *arsRC* y *arsBH*. Sin embargo en *P. putida* y *P. aeruginosa* los genes del operón *arsRBCH* se co-transcriben en la misma orientación. En *E. coli* y *P. putida* la transcripción del operón *ars* se activa por arsenito (Paez-Espino y col., 2015; Páez-Espino y col., 2009; Slyemi & Bonnefoy, 2012; Yamamura & Amachi, 2014).

En procariotas existen dos familias diferentes de bombas de expulsión de arsenito, las proteínas de la familia ArsB y las de la familia de transportadores ACR3. Esta última se encuentra mayoritariamente en Actinobacterias y Alfa-proteobacterias. Para la enzima reductasa citoplasmática ocurre algo parecido, existen tres familias de proteínas que se diferencian en sus estructuras (Escudero y col., 2013; Páez-Espino y col., 2009; Slyemi & Bonnefoy, 2012). Por un lado, se encuentra la reductasa de arseniato asociada a tiorredoxina (ArsC del plásmido pI258 de *S. aureus*, *B. subtilis* y *P. putida*).

Por otro lado, se encuentra la familia de reductasas asociadas a glutarredoxina (reductasa ArsC del plásmido R773 de *E. coli* y la reductasa eucariota ACR2p de *Saccharomyces cerevisiae*). Y por último, se encuentra la reductasa asociada a micorredoxina (en Actinobacterias). Todas las reductasas son enzimas redox citoplasmáticas que convierten arseniato en arsenito por una reacción secuencial (Escudero y col., 2013; Páez-Espino y col., 2009; Slyemi & Bonnefoy, 2012).

En cuanto a la metilación de arsenito en bacterias, la hipótesis general es que consiste en una serie de reacciones en las que el arsénico es inicialmente reducido, pasando posteriormente por un ciclo de oxidación por la adición de grupos metilos, formándose metil arsenito (MMA), dimetil arseniato (DMA-V), dimetil arsenito (DMA-III) y óxido de trimetil arsina (TMAO). En algunos procariotas se ha descrito el gen *arsM* como responsable de toda la metilación dependiente de S-adenosil metionina (SAM) (Páez-Espino y col., 2009; Slyemi & Bonnefoy, 2012).

Para llevar a cabo todos estos procesos los organismos deben ser capaces de detectar el arsénico. Hasta hoy se han propuesto 4 reguladores para los sistemas descritos anteriormente: ArsR, ArsD, AoxSR y AoxF. ArsR y ArsD reprimen el operón *ars* en ausencia de As(III) o Sb(III), mientras que AoxSR y AoxF se han descrito como inductores del operón que codifica la arsenito oxidasa en presencia de As(III).

En ausencia de metaloide, el ArsR se une en forma de homodímero a la posición -35 del promotor del operón *ars* bloqueando la iniciación de la transcripción. La unión de As(III) y Sb(III) a ArsR produce un cambio conformacional que libera a la proteína del ADN y permite el inicio de la transcripción. Existen también ejemplos de inducción de la expresión del operón *ars* en presencia tanto de arsenito como de arseniato, como es el caso del operón *ars* de *B. subtilis* (Sato & Kobayashi, 1998). En *Shewanella trabarsenatis* ANA-3, ArsR regula no solo al operón *ars* sino también al operón *arr* que codifica la arseniato reductasa para la respiración (Slyemi & Bonnefoy, 2012).

Aunque ArsD tiene también una débil actividad represora, su principal función es transferir As(III) y Sb(III) a ArsA. ArsD también se une como homodímero al ADN en la misma zona que ArsR pero con menor afinidad. ArsR y ArsD actúan juntos, pero de manera independiente, para regular los niveles de expresión basales y máximos respectivamente.

Con niveles de concentración de As(III) y Sb(III) bajos, ArsR se libera del ADN y permite la expresión del operón *ars*, cuando los niveles de ArsD sobrepasan un umbral, ArsD reprime la expresión del operón, impidiendo así la sobreexpresión tóxica de la proteína de membrana ArsB (Slyemi & Bonnefoy, 2012).

4.1.2.2. Homeostasis de metales esenciales (cobalto, zinc, cadmio y cobre)

A diferencia del arsénico, algunos metales de transición son componentes esenciales de un gran número de proteínas, donde realizan una función catalítica o estructural. Por tanto, todos los organismos poseen mecanismos para asegurar el suministro adecuado de cationes divalentes de cobalto, níquel, cobre y zinc, evitando también su efecto tóxico si se acumulan intracelularmente. Esta capacidad para captar cationes metálicos está relacionada con el crecimiento, la resistencia a estrés y la capacidad patógena de los organismos.

Después del hierro, el zinc es el segundo ion metálico de transición más abundante en los organismos vivos. Estudios inicialmente llevados a cabo en *E. coli* y posteriormente confirmados en otros microorganismos han establecido que la homeostasis del zinc está controlada por la actividad coordinada de los sistemas de transporte y expulsión regulados por Zur y ZntR, dos metaloproteínas capaces de regular la transcripción génica dependiendo de su estado de metilación. Zur controla la expresión de unos pocos genes responsables de la respuesta de bacterias a la escasez de zinc y es capaz de reaccionar a cambios femtomolares en la concentración. La unión del ion metálico a Zur provoca que éste reprima la expresión del transportador de Zn de alta afinidad ZnuABC, un transportador de la familia ABC que se activa en muchas bacterias por la deficiencia de zinc (Figura 50). El transportador está constituido por tres proteínas: ZnuB es la permeasa de membrana; ZnuC es el componente ATPasa que aporta la energía para el transporte; y ZnuA es una proteína periplásmica soluble que captura Zn(II) y lo transporta a ZnuB. Un gen adicional (*zinT*) regulado por Zur se identificó en *E. coli* y en *Salmonella enterica* serovar typhimurium; en esta última se ha descrito su intervención en la captación de zinc mediada por ZnuABC (Petrarca y col., 2010).

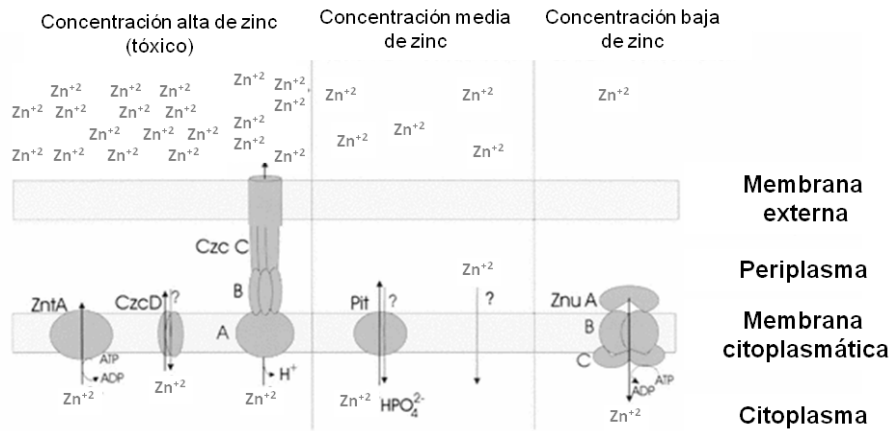


Figura 50. Vías de captación y eliminación de Zn^{+2} en bacterias Gram-negativas dependiendo de la concentración de zinc. A concentraciones limitantes de zinc los transportadores ABC se inducen (ZnuABC, derecha). El transportador de baja afinidad de fosfato Pit puede actuar como co-transportador para ayudar a satisfacer la demanda de zinc en la célula a concentraciones medias (centro). Los transportadores al exterior CzcABC actúan en condiciones tóxicas de zinc protegiendo a la célula, al igual que las ATPasas tipo P como ZntA (izquierda). No se conoce mucho sobre el transporte de cationes divalentes a través de la membrana externa ni sobre el sistema que utilizan los organismos para transportar zinc en condiciones de abundancia (centro). Figura modificada de Hantke (2001)

Además de estos transportadores específicos y regulados, para los metales esenciales existen también transportadores no específicos y constitutivos, de baja afinidad, que transportan metales en condiciones de exceso de los mismos, sin alcanzar condiciones tóxicas, cuando *znuABC* está reprimido por Zur. Un ejemplo es el co-transporte de Zn^{+2} con fosfato, mediante el transportador de fosfato inorgánico Pit (Figura 50). Este sistema de transporte parece ser el responsable de la captación de Zn^{+2} , siendo probablemente también responsable de la expulsión del ión de la célula. Otro ejemplo es la permeasa CitM de *Bacillus subtilis*, que es una proteína del transporte al interior de metal-citrato, con una amplia especificidad (Mg^{+2} , Ni^{+2} , Mn^{+2} , Co^{+2} y Zn^{+2}) (Choudhury & Srivastava, 2001).

Se han descrito mecanismos de resistencia para estos metales esenciales ya que en exceso son tóxicos para las células bacterianas. Los mecanismos de resistencia de iones metálicos como el zinc son muy interesantes porque ayudan a entender los procesos de homeostasis de la célula.

La resistencia de microorganismos a niveles tóxicos de zinc puede llevarse a cabo de diversas formas: una es el sistema de expulsión por antiporte, el sistema Czc (Figura 50), que confiere resistencia a cadmio, zinc y cobalto. El operón *czc* del plásmido pMOL30 en *Ralstonia eutrophus* consiste en tres genes estructurales, *czcC*, *czcB* y *czcA*, cuyos productos forman el complejo de la bomba de expulsión de cationes. Las proteínas CzcA, CzcB y CzcC pertenecen a la familia de proteínas RND (resistencia, nodulación, división) y forman un sofisticado sistema de transporte que expulsa Zn^{+2} , Co^{+2} y Cd^{+2} a lo largo de las dos membranas celulares, protegiendo también el espacio periplásmico. CzcC ha sido descrita como una proteína transportadora de la membrana externa, CzcB una proteína periplásmica que canaliza cationes a lo largo de el espacio periplásmico, conectando la membrana plasmática (CzcA) con la membrana externa (CzcC). CzcA es una proteína antiporte catión/ H^+ , de la membrana plasmática, compuesta por 12 polipéptidos transmembrana y dos dominios periplásmicos conectados a CzcB. Está descrito que para alcanzar un nivel alto de resistencia no es suficiente la actividad de la proteína CzcA (Choudhury & Srivastava, 2001).

En *Waustersia metallidurans* CH34 se ha descrito un operón *czcNICBADRS* en un plásmido que le aporta a esta bacteria una alta resistencia a zinc, cobalto y cadmio por la expresión de dos sistemas de expulsión de estos metales (CzcCBA y CzcD). CzcD, presente también en *Bacillus subtilis*, es un miembro de la familia de transportadores facilitadores de difusión de cationes (CDF) a través de la membrana plasmática, que parece ejercer la primera línea de defensa en este organismo. *W. metallidurans* CH34 también posee otros miembros de la familia de proteínas CDF, FieF y DmeF, que también intervienen en la resistencia a estos cationes. CzcS y CzcR pertenecen a la familia de reguladores de dos componentes, que incluye una proteína reguladora sensora (CzcS) y otra reguladora (CzcR) y cuya función parece ser la regulación de los genes estructurales *czc* (Hantke, 2001; Munkelt y col., 2004). En *S. aureus* la resistencia a Zn^{+2} está mediada por *czrAB*, donde CzcA es la proteína reguladora y CzcB es un miembro de la familia de CDF, homólogo de CzcD de *B. subtilis* (Kuroda y col., 1999).

Otro método de resistencia descrito consiste en la expulsión de los iones de la célula por la acción de una ATPasa de tipo P, constituida por una clase de proteínas transportadoras de membrana que sirven para mantener las condiciones iónicas adecuadas. La ATPasa de tipo P (ZntA) de *E. coli* tiene una alta similitud a la ATPasa CadA de *S. aureus* y *Helicobacter pilori*. Ambas controlan el contenido celular de zinc y cadmio, y también confieren resistencia a estos iones metálicos mediante el transporte dependiente de ATP. La proteína Znt también puede ser activada por cadmio, plomo y plata. ZntA y CadA son proteínas multifunción que también intervienen como bombas de expulsión de Pb^{+2} , de hecho su función principal parece ser el transporte al exterior de Cd^{+2} y Pb^{+2} , mientras que la expulsión de Zn^{+2} parece ser solo una función adicional. ZntR, miembro de la familia ArsR, activa la transcripción de *zntA* en *E. coli* por Cd^{+2} , Zn^{+2} y Pb^{+2} . CadC, proteína con alta similitud a ArsR, regula *cadA*. En el caso del gen *cadA* de *B. subtilis*, la regulación tanto de este gen como del gen *czcD*, está regulada por CzcR (Moore y col., 2005). ZiaA es otro ejemplo de este tipo de ATPasas, que se ha caracterizado en *Synechocystis* PCC6803, donde también se ha descrito una proteína reguladora llamada ZiaR que reprime a *ziaA*. ZiaR está relacionada con SmtB, regulador de la expresión del gen *smtA*, el cual codifica una proteína de unión a zinc del tipo metalotioneína (Cavet y col., 2003; Choudhury & Srivastava, 2001; Hantke, 2001).

En la resistencia a Co también interviene el sistema de transporte CorABCD. CorA interviene en el aporte a la célula de los iones Mg^{+2} , Co^{+2} y Ni^{+2} , mientras que CorB, CorC y CorD son proteínas transportadoras encargadas de la expulsión de estos cationes divalentes (Kehres y col., 1998; Smith y col., 1998a; Smith y col., 1998b; Sponder y col., 2010; Wang y col., 2003).

El cobre es otro de los elementos trazas esenciales para muchos organismos, formando parte de los grupos prostéticos fundamentalmente de enzimas oxidativas. A pesar de ser esencial, el cobre en exceso es tóxico y por esto se ha utilizado mucho como bactericida para el control de enfermedades bacterianas en plantas. Aunque su efectividad está bajando debido a la aparición de cepas bacterianas resistentes al cobre.

El mecanismo que determina la resistencia a cobre en *Xanthomonas campestris* panthovar (pv.) *vesicatoria* y en *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* esta mediado por un plásmido que contiene cuatro genes (*copA*, *copB*, *copC* y *copD*), los cuales se organizan en un operón con un promotor inducible por el metal. La capacidad de las proteínas periplásmicas CopA y CopC para unir cobre indica que su función en la resistencia al metal es el secuestro de éste en el periplasma para que no penetre en el citoplasma celular. CopB sin embargo es una proteína de la membrana externa que también une cobre, pudiendo estar implicada en su transporte a través de la membrana (Canovas y col., 2003; Cha & Cooksey, 1991). En *Enterococcus hirae* los niveles intracelulares de este metal se controlan gracias a diferentes proteínas como la ATPasa de captación (CopA), la ATPasa de expulsión (CopB), una chaperona (CopZ) y un represor (CopY) (Reyes y col., 2006). En *Streptococcus pyogenes* la resistencia a cobre está mediada por el operón *copYAZ*, donde CopA parece actuar como ATPasa de expulsión (Young y col., 2015).

En *E. coli* el mecanismo de resistencia a Cu está mediado, entre otros, por los genes *cusCBA*, *cutABCDEF* y *copA* que están involucrados en la captación, almacenamiento y eliminación de cobre en este organismo (Cooksey, 1993; Gupta y col., 1995). Además, muchas bacterias utilizan oxidasas como mecanismos de resistencia al exceso de cobre (Rademacher & Masepohl, 2012).

4.1.2.3. Resistencia a cromo

El cromo es un metal tóxico no esencial para microorganismos y plantas. Este metal existe en la naturaleza en dos formas principales, la trivalente Cr(III) y la hexavalente Cr(VI). El cromato Cr(VI) es considerado la forma más tóxica del cromo. A nivel extracelular la toxicidad se debe a su rápida entrada al citoplasma celular donde ejerce realmente su efecto tóxico, que se asocia a la inhibición del transporte de membrana de sulfato y el daño oxidativo a las biomoléculas.

La inhibición del transporte de sulfato se debe a que en muchas bacterias el cromato atraviesa activamente las membranas biológicas utilizando el mismo sistema que el sulfato. Por otra parte, la reducción del Cr(VI) a estados de oxidación menores [Cr(III) y Cr(V)] libera radicales libres que pueden producir daño oxidativo al ADN (Cheunga & Gu, 2007; Ramírez-Díaz y col., 2008).

El Cr(III) entra en la célula con muy poca eficiencia debido a su insolubilidad y consecuentemente a su incapacidad para cruzar la membrana. A nivel intracelular el Cr(III) parece ser el responsable de la mayor parte de los efectos tóxicos del metal, debido a su habilidad para unirse al fosfato en el ADN. Otros efectos tóxicos adicionales del Cr(III) se deben a su capacidad de unirse al grupo carboxil y sulfhidrilo de proteínas (Cheunga & Gu, 2007; Ramírez-Díaz y col., 2008).

Se han descrito varios mecanismos bacterianos de resistencia al cromato, como la detoxificación de radicales libres, reparación de daños del ADN y procesos relacionados con la homeostasis de azufre e hierro. Los mecanismos mejor caracterizados son la expulsión de iones cromato y la reducción extracelular de Cr(VI) a Cr(III) (Tabla 33) (Cheunga & Gu, 2007; Ramírez-Díaz y col., 2008; Viti y col., 2014).

Los genes de resistencia que codifican los transportadores suelen ser plasmídicos, mientras que los que codifican los genes relacionados con la reducción suelen ser cromosómicos.

Tabla 33. Mecanismos bacterianos de tolerancia al cromato

Enzima/sistema	Bacteria	Función
Rodanasa (ChrE)	<i>Cupriavidus metallidurans</i>	Ruptura de complejos Cr-Glutatión
ChrA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Expulsión del cromato del citoplasma
Receptor TonB, transportador de hemina	<i>Shewanella oneidensis</i>	Transporte de hierro
Varios productos del operón Cys	<i>Shewanella oneidensis</i>	Transporte y metabolismo de azufre
Cromato reductasas	Diversas especies	Conversión de Cr(VI) a Cr(III)
SOD, catalasas	<i>Escherichia coli</i>	Combate el estrés oxidativo
SOD, Glutatión transferasa	<i>Caulobacter crescentus</i>	Combate el estrés oxidativo
Enzima málica y piridina nucleótido transhidrogenasa	<i>Pseudomonas corrugata</i>	Combate el estrés oxidativo
Proteínas de membrana externa	<i>Caulobacter crescentus</i>	Respuesta general a estrés
Fe-SOD (ChrC) (superóxido dismutasa)	<i>Cupriavidus metallidurans</i>	Detoxificación de radicales libres
Respuesta SOS	<i>Escherichia coli</i>	Reparación de daños del DNA
DNA Helicasas (RecG y RuvB)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Reparación de daños al DNA
Helicasas SO0368, UvrD y HrpA	<i>Shewanella oneidensis</i>	Reparación de daños del ADN
Adenilil sulfato quinasa	<i>Shewanella oneidensis</i>	Metabolismo del azufre
Sulfito reductasa	<i>Shewanella oneidensis</i>	Metabolismo del azufre
Ferritina	<i>Shewanella oneidensis</i>	Unión de hierro

*Tabla modificada de Martha I. Ramirez-Díaz y colaboradores (2006)

La proteína ChrA es la responsable de la resistencia a cromato debido a que funciona como una bomba quimiosmótica que expulsa cromato del citoplasma. El gen *chrA* suele localizarse en un operón, flanqueado por distintos genes (*tnpA*, *tnpR*, *chrB*, *chrC*, *chrE*, *chrF*, *chrI*, *chrJ*, *chrK* y *chrL*) cuya importancia en la resistencia a cromato depende del organismo. La expulsión de cromato es inhibida por sulfato, sugiriendo que este oxianión análogo puede unirse también a ChrA. Este mecanismo está muy extendido entre todos los microorganismos estudiados (Cheunga & Gu, 2007; Ramirez-Díaz y col., 2008; Viti y col., 2014).

Existe un amplio grupo de bacterias capaces de llevar a cabo una reducción completa del Cr(VI) a Cr(III) por reacciones de oxidación/reducción. Se han descrito tres mecanismos (Cheunga & Gu, 2007; Ramírez-Díaz y col., 2008; Viti y col., 2014):

1. Reducción en condiciones aeróbicas mediante cromato reductasas (ChrR de *P. putida*), solubles o de membrana, que utilizan NADH o NADPH como cofactores (Ackerley y col., 2004b).
2. Reducción en condiciones anaeróbicas, donde el Cr(VI) se usa como un aceptor de electrones en la cadena de transporte de electrones (Chardin y col., 2002).
3. Reducción indirecta mediante reacciones químicas asociadas a compuestos redox como aminoácidos, nucleótidos, azúcares, vitaminas, ácidos orgánicos o glutatión (Cervantes y col., 2001).

Además hay reductasas que tienen una doble función, siendo la actividad cromato reductasa una actividad secundaria. Ejemplos de estas son la nitroreductasas NfsA/NfsB de *Vibrio harveyi* y la reductasa férrica FerB de *Paracoccus denitrificans* (Gutiérrez Corona & Cervantes, 2008; Viti y col., 2014).

Una protección adicional al efecto tóxico del cromo está asociada a reducir la absorción de Cr(VI) a través del sistema de captación de sulfato (transportadores ABC) y a la homeostasis de azufre y hierro. Un ejemplo es el caso de *Caulobacter crescentus* que no tiene sistema de expulsión de cromato y en condiciones de estrés de cromo se reprime el sistema de transporte de sulfato, reduciendo probablemente la entrada de cromato a la célula (Cheunga & Gu, 2007; Ramírez-Díaz y col., 2008). Otros ejemplos de mecanismos de resistencia a cromato son la producción de exopolisacáridos, endocitosis mediada por actina, compartimentalización vacuolar y síntesis de trehalosa (Viti y col., 2014).



4. CAPÍTULO 2

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS



4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Material biológico

4.2.1.1. Cepas bacterianas

En la Tabla 34 se muestran las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.

Tabla 34. Cepas bacterianas

Cepa bacteriana	Características relevantes	Fuente o referencia
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F ⁻ , <i>lacZ</i> Δ M15, <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> Δ (<i>lacZYA argF</i>) Nal ^R	Hanahan (1983)
<i>E. coli</i> W3110	K-12 F ⁻ (<i>rmD-rmE</i>)	Bachmann (1987)
<i>E. coli</i> AW3110	Cepa de <i>E. coli</i> W3110 conteniendo una deleción del operón cromosómico <i>ars</i> (Δ <i>arsRBC::cam</i>)	Carlin y col. (1995)

4.2.1.2. Plásmidos

Plásmidos utilizados

Los plásmidos de clonación utilizados en este trabajo se muestran en la Tabla 35.

Tabla 35. Plásmidos

Plásmido	Características relevantes	Fuente o referencia
pVLT31	Derivado de pMMB207, <i>lac</i> ^f / <i>Ptac</i> , Tc ^R	de Lorenzo y col. (1993a)
pIZ1016	Derivado de pBBRIMCS-5 <i>lac</i> ^f / <i>Ptac</i> , Gm ^R	Martinez-Perez y col. (2004)

Gm^R: resistencia a Gentamicina; Tc^R: resistencia a Tetraciclina; P*lac*: promotor del operón *lac*

Plásmidos construidos

Los plásmidos construidos durante el desarrollo de este trabajo se muestran en la Tabla 36.

Tabla 36. Plásmidos construidos

Plásmido	Cepa hospedadora	Características relevantes
pIZ1016-arsC 2854	<i>E. coli</i> DH5 α	Derivado de pIZ1016-Gm ^R con un fragmento de 0,432 Kb que contiene el ORF de la hipotética reductasa de arsénico ArsC 2854 de <i>Terribacillus</i> sp. AE2B 122, amplificado a partir del ADN genómico de este organismo con los oligonucleótidos MAO406 y MAO407 y clonado en <i>EcoRI</i> y <i>XbaI</i>
pIZ1016-arsC 3384	<i>E. coli</i> DH5 α	Derivado de pIZ1016-Gm ^R con un fragmento de 0,390 Kb que contiene el ORF de la hipotética reductasa de arsénico ArsC 3384 de <i>Terribacillus</i> sp. AE2B 122, amplificado a partir del ADN genómico de este organismo con los oligonucleótidos MAO403 y MAO404 y clonado en <i>EcoRI</i> y <i>XbaI</i>
pVLT31-arsB 3675	<i>E. coli</i> DH5 α	Derivado de pVLT31-Tc ^R con un fragmento de 1,335 Kb que contiene el ORF de la hipotética bomba de arsénico ArsB 3675 de <i>Terribacillus</i> sp. AE2B 122, amplificado a partir del ADN genómico de este organismo con los oligonucleótidos MAO393 y MAO394 y clonado en <i>EcoRI</i> y <i>KpnI</i>
pVLT31-arsB 2733	<i>E. coli</i> DH5 α	Derivado de pVLT31-Tc ^R con un fragmento de 1,395 Kb que contiene el ORF de la hipotética bomba de arsénico ArsB 2733 de <i>Terribacillus</i> sp. AE2B 122, amplificado a partir del ADN genómico de este organismo con los oligonucleótidos MAO398 y MAO399 y clonado en <i>EcoRI</i> y <i>KpnI</i>

4.2.2. Medios y condiciones de cultivo

Los medios de cultivo que se describen a continuación se ajustaron al pH deseado con NaOH 1 M (pH 7 - 7,5) y se esterilizaron en autoclave a una temperatura de 121°C durante 20 minutos. Para la preparación de los medios de cultivo sólidos se utilizó Bacto-Agar (Difco) a una concentración del 2%.

4.2.2.1. Medios para el estudio de resistencia a metales en medio líquido

Para el análisis de resistencia a metales se utilizó el medio PYA+1,5% NaCl (ver apartado 3.2.2.1.) y el medio PYA-P+1,5% NaCl, adicionado con distintas concentraciones de distintos metales. El medio PYA-P+1,5% NaCl se obtuvo mediante la eliminación del P del medio PYA+1,5% NaCl siguiendo el método descrito a continuación:

- 1- Diluir en 130 ml de H₂O destilada los componentes de 150 ml de medio PYA+1,5 % de NaCl.
- 2- Añadir, a estos 130 ml de medio, 1,5 ml de sulfato de magnesio 1 M y 1,5 ml de amoníaco al 25%.
- 3- Dejar 1 hora a T^a ambiente.
- 4- Filtrar con papel Whatman.
- 5- Ajustar el pH a 7,5, enrasar hasta 150 ml con H₂O destilada y autoclavar.

4.2.2.2. Medios para el crecimiento de las cepas de *E. coli*

Los clones de *E. coli* AW3110 con los genes de resistencia a arsénico en pIZ1016 y pVLT31 se crecieron y mantuvieron en medio LB + 1% de glucosa adicionado con Gm y Tc, respectivamente. En los estudios de complementación heteróloga con *E. coli* AW3110, se utilizó el medio PYA + NaCl 1,5% + 1% de glucosa adicionado con Gm o Tc y distintas concentraciones de arseniato [As(V)] y arsenito [As(III)]. Para la inducción de los genes clonados en pIZ1016 y pVLT31, en los ensayos de complementación heteróloga, se sustituyó la glucosa por 10 µM o 1 mM de IPTG. Para el estudio de la resistencia a estrés oxidativo se utilizó medio LB adicionado con distintas concentraciones de H₂O₂.

Todos los medios del análisis de complementación heteróloga, se usaron añadiendo 2% de agar para obtener placas de medio sólido. Las placas inoculadas con las distintas cepas y clones se incubaron a una temperatura de 30°C.

4.2.3. Compuestos antimicrobianos

Cuando fue necesario, se incluyeron en los medios de cultivo los correspondientes compuestos antimicrobianos (Roche) (Tabla 37). En el caso de la Gentamicina se utilizó la esterilización por filtración. Todas las soluciones se conservaron a -20°C .

Tabla 37. Soluciones de compuestos antimicrobianos

Antimicrobiano	Disolvente	Concentración de almacenaje (mg/ml)	Concentración final para <i>E. coli</i> ($\mu\text{g/ml}$)
Gentamicina (Gm)	Agua destilada estéril	10	10
Tetraciclina (Tc)	Etanol 70 %	12,5	12,5

4.2.4. Extracción, manipulación y purificación de ADN

Se siguieron las indicaciones descritas en el apartado 3.2.5. del capítulo 1.

4.2.4.1. Cebadores para amplificación por PCR

Tabla 38. Cebadores diseñados para la amplificación y secuenciación de ADN

Cebador	5'-Secuencia-3'	Nº de bases	Tm (°C)	% GC	Uso
MAO393	ACAGA <u>ATT</u> CAAAG AGGAGAAATTAAG CATGTTAACAAC TTC	43	62	33	Amplificación del ORF ArsB 3675 de <i>Terribacillus</i> sp. AE2B 122, a partir de ADN genómico
MAO394	CCGGGTACCTTAA TGGATGATGGATA ACCAAATA	34	61	41	
MAO398	ACAGA <u>ATT</u> CAAAG AGGAGAAATTAAG CATGACATTAGAA ATAG	43	61	30	Amplificación del ORF ArsB 2733 de <i>Terribacillus</i> sp. AE2B 122, a partir de ADN genómico
MAO399	CCGGGTACCTTAA CTAAAAACTATTTT GACCCAG	34	62	44	
MAO160	TGACAATTAATCAT CGGCTCG	21	53	43	Comprobación de clones positivos en pVLT31 y pIZ1016 mediante PCR de colonias
MAO173	CGAAGTAATCGCA ACATCCGC	21	57	52	Comprobación de clones positivos en pVLT31 mediante PCR de colonias
MAO403	ACAGA <u>ATT</u> CAAAG AGGAGAAATTAAG CATGTTCCGATTTT ATTGG	45	63	33	Amplificación del ORF ArsC 3384 de <i>Terribacillus</i> sp. AE2B 122, a partir de ADN genómico
MAO404	CGCTCTAGACTAA GCAGTTACAGCCT CGTATGCT	34	65	50	Amplificación del ORF ArsC 3384 de <i>Terribacillus</i> sp. AE2B 122, a partir de ADN genómico. Comprobación de clones positivos de ArsC 3384 en pIZ1016 mediante PCR de colonias
MAO406	ACAGA <u>ATT</u> CAAAG AGGAGAAATTAAG CATGGTAACA CTTATACC	45	63	33	Amplificación del ORF ArsC 2854 de <i>Terribacillus</i> sp. AE2B 122, a partir de ADN genómico
MAO407	CGCTCTAGATCAG TTGACCATACGCT GTGCTTCA	34	65	50	Amplificación del ORF ArsC 2854 de <i>Terribacillus</i> sp. AE2B 122, a partir de ADN genómico. Comprobación de clones positivos de ArsC 2854 en pIZ1016 mediante PCR de colonias

*Las dianas de restricción incluidas en los cebadores se indican mediante subrayado.

4.2.5. Complementación heteróloga de *E. coli* AW3110 con los genes *ars* de *Terribacillus* sp. AE2B 122

La estrategia seguida para la clonación de los genes fue la siguiente:

En primer lugar se realizó la construcción de los plásmidos pVLT31-*arsB* 3675, pVLT31-*arsB* 2733, pIZ1016-*arsC* 3384 y pIZ1016-*arsC* 2854 con el fin de clonar los correspondientes genes en un vector replicativo, bajo el control del promotor inducible Ptac. Esto nos permitió llevar a cabo ensayos de complementación heteróloga de resistencia a arsénico en *Escherichia coli* AW3110 (Δ *ArsRBC*).

Para la construcción de **pVLT31-*arsB* 3675** se amplificó por PCR el gen *arsB* 3675 a partir del ADN genómico de *Terribacillus* sp. AE2B 122, utilizando la pareja de cebadores, **MAO393** y **MAO394**. Tras la amplificación, el producto de PCR obtenido (1335 pbs) se digirió con las enzimas *EcoRI* y *KpnI* y se aisló el fragmento de 1327 pbs. Este fragmento se clonó en el vector pVLT31 digerido con las mismas enzimas (fragmento de 9618 pbs) (Figura 51 A). Las clonaciones se transformaron en *E. coli* DH5 α y los transformantes de DH5 α obtenidos, seleccionados en medio LB + tetraciclina (Tc), se analizaron mediante PCR de colonias con los cebadores **MAO160** y **MAO173**. Los clones con inserto contenían un producto de 1634 pbs y los clones negativos, al contrario, contenían un producto \leq 307 pbs. Tras seleccionar dos clones positivos independientes de la nueva construcción **pVLT31-*arsB* 3675**, se preparó ADN plasmídico y se envió a secuenciar utilizando los cebadores **MAO160** y **MAO173**.

Para la construcción de **pVLT31-*arsB* 2733** se siguió el mismo esquema, pero utilizando los cebadores **MAO398** y **MAO399**. Así se generó un fragmento de 1395 pbs (Figura 51B). Para la secuenciación de los clones positivos se utilizaron los cebadores **MAO160** y **MAO173**.

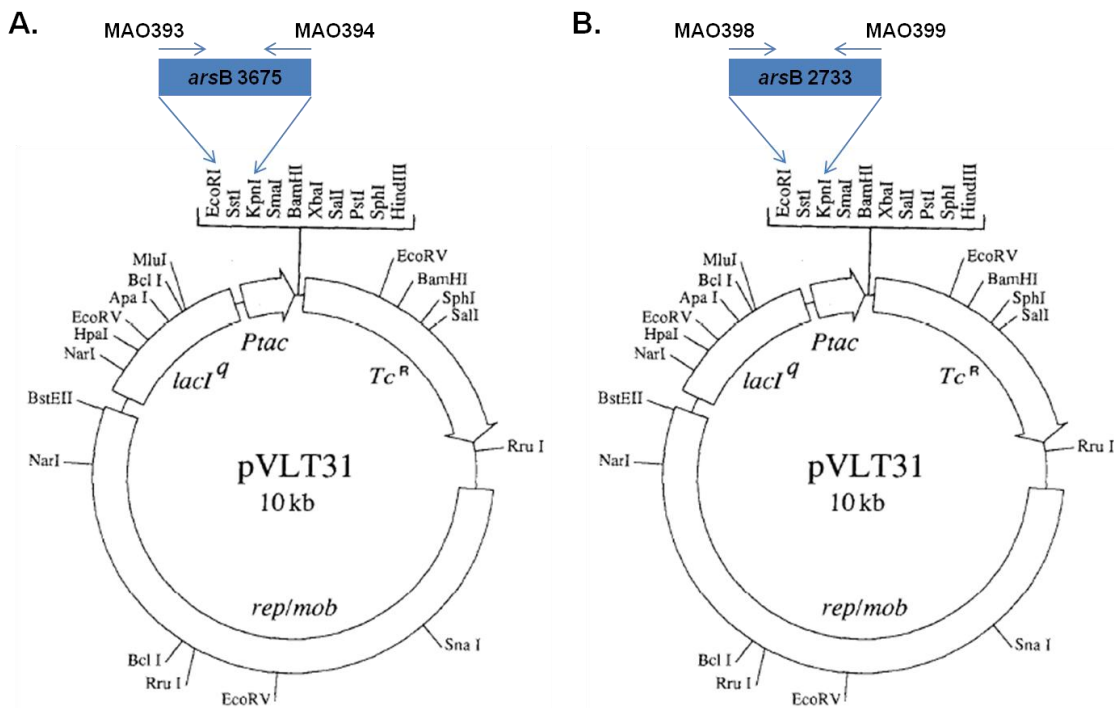


Figura 51. Construcción pVLT31-*arsB* 3675 (A) y construcción pVLT31-*arsB* 2733 (B). *lacIq*: gen represor del promotor *Ptac*. *rep/mob*: regiones que contienen las funciones de replicación y movilización, respectivamente. Figura modificada de Lorenzo, V. y col. (de Lorenzo y col., 1993a)

Para la construcción de **pI21016-*arsC* 3384** se siguió la misma estrategia que para las construcciones de los genes *arsB*, empezando por amplificar mediante PCR el gen *arsC* 3384 a partir del ADN genómico de *Terribacillus* sp. AE2B 122 utilizando la pareja de cebadores **MAO403** y **MAO404** (Figura 52A). A continuación se digirió el producto de PCR obtenido (390 pbs) con las enzimas *EcoRI* y *XbaI*, se purificó el fragmento de 378 pbs resultante y se clonó en el vector pI21016 digerido con las mismas enzimas (fragmento de 5979 pbs). Los transformantes (colonias blancas) de *E. coli* DH5 α obtenidos, seleccionados en medio LB adicionado con 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-gal) y gentamicina (Gm), se analizaron mediante PCR de colonias con los cebadores **MAO160** y **MAO404**. En los clones con inserto se amplificó un producto de 454 pbs. Se seleccionaron dos clones positivos independientes de la nueva construcción **pI21016-ArsC 3384**, y se preparó ADN plasmídico para enviar a secuenciar con los cebadores **MAO160** y **MAO404**.

Para la construcción de **pIZ1016-arsC 2854** (Figura 52 B) se amplificó por PCR el gen *arsC2854* a partir del ADN genómico de *Terribacillus* sp. AE2B 122, utilizando la pareja de cebadores, **MAO406** y **MAO407** que genera un producto de PCR de 432 pbs. Los siguientes pasos fueron similares a la construcción de **pIZ1016-arsC3384**, utilizando en este caso para el análisis de los transformantes positivos, los cebadores **MAO160** y **MAO407**. Las colonias positivas conteniendo el inserto generaron un producto de PCR de 496 pbs.

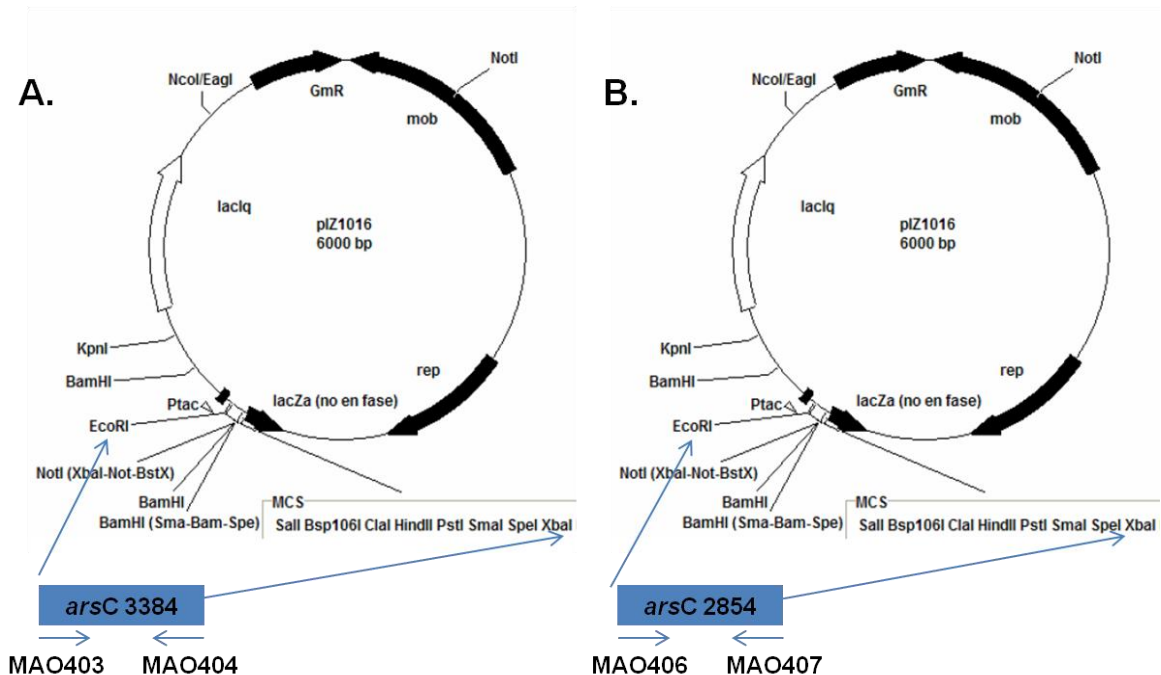


Figura 52. Construcción de pIZ1016-*arsC* 3384 (A) y pIZ1016-*arsC* 2854 (B). *lacIq*: gen represor del promotor *Ptac*. *lacZ*, gen que permite la selección blanco/azul sobre estirpes de *E. coli* con la mutación *deoR* ($f80\Delta lacD(lacZ)M15$). *rep/mob*: regiones que contienen las funciones de replicación y movilización, respectivamente. Figura modificada de Chirino Chace & Pilar (2009)

El ADN plasmídico de los clones positivos de *E. coli* DH5 α se transformó mediante choque térmico en células competentes de *E. coli* AW3110 ($\Delta ArsRBC$). Se realizaron transformaciones simples de pVLT31-*arsB* 3675, pVLT31-*arsB* 2733, pIZ1016-*arsC* 3384 y pIZ1016-*arsC* 2854, y transformaciones dobles con las distintas combinaciones de pVLT31-*arsB*/pIZ1016-*arsC*.

Las transformaciones de las construcciones con pVLT31-*arsB* se sembraron en placas de LB+Glu 1% + Tc, las de pIZ1016-*arsC* en LB+Glu 1% + Gm y las dobles transformaciones pVLT31-*arsB* / pIZ1016-*arsC* en placas de LB+Glu 1% + Tc + Gm. Las colonias obtenidas en cada transformación se crecieron en su correspondiente medio líquido (LB+Glu 1% + Tc, LB + Glu 1% + Gm o LB + Glu 1% + Tc + Gm) y se extrajo el ADN plasmídico. El ADN plasmídico pVLT31-*arsB* 3675 y pVLT31-*arsB* 2733 se comprobó mediante restricción con las enzimas *EcoRI* y *KpnI*. Los clones positivos produjeron fragmentos de 1327 (*arsB*3675) y 1387 pbs (*arsB*2733). El ADN plasmídico pIZ1016-*arsC* 3384 y pIZ1016-*arsC* 2854 se comprobó por restricción con *EcoRI* y *XbaI*, produciendo fragmentos de 378 y 420 pbs respectivamente, correspondientes al inserto y 6000 pbs correspondiente al plásmido.

Los ensayos de complementación heteróloga se realizaron sembrando por duplicado 10 μ l de cultivos ajustados a una DO_{600nm} final de 0,5 de estos clones positivos, junto a *Terribacillus* sp. AE2B 122, *E. coli* W3110 y *E. coli* AW3110, en placas de PYA+1,5% NaCl, adicionadas con distintas concentraciones de arseniato (AsV) o arsenito (AsIII) y glucosa o IPTG. Para los ensayos de estrés oxidativo se sembraron gotas de 2 μ l de diluciones crecientes de los transformantes de *arsC* 2854 y *arsC* 3384, junto a *E. coli* W3110 y *E. coli* AW3110, en placas de LB adicionadas con distintas concentraciones de H_2O_2 .

4.2.6. Extracción y análisis del ARN

Se siguieron las indicaciones descritas en el apartado 3.2.6., utilizando los cebadores descritos a continuación (Tabla 39).

Tabla 39. Cebadores utilizados en la RT-qPCR

Cebador	5´-Secuencia-3´	Amplificación del gen de <i>Terribacillus</i> sp. AE2B 122
gyrA122F gyrA122R	AATCGAAAAAGGCGAATGGA TCCGTTTGGAAATCCCTTGTT	subunidad A de la Girasa
rpoB122F rpoB122R	AGAATATCTTGGAGCCGCATGA TAGTGTACGTTGCCTTCTGGAT	subunidad β de la ADN polimerasa
ArsB2733F ArsB2733R	TTGAAGTGGATGGACTATCTCAAAGT TTTTGACCCAGTAATAGAGTAGGAACAA	<i>arsB</i> 2733, homólogo de la bomba de As(III)
ArsB3675F ArsB3675R	CCCAAAAAGGTGTCAAATATCG GGATAACCAATATAAAGTCCTGTTAGTGTT	<i>arsB</i> 3675, homólogo de la bomba de As(III),
ArsC2854F ArsC2854R	GCGTTTGCAGGTAGGCTACAA CAACTGGAATGTACGCACAGTTC	<i>arsC</i> 2854, homólogo de la reductasa de As(V)
ArsC3384F ArsC3384R	GGAGAAAATCAAAGAGGCAGATG GACGCTTAATCAGCATACCGTTT	<i>arsC</i> 3384, homólogo de la reductasa de As(V)
ArsR2310F ArsR2310R	ACGTGGAAACAGCTCGAAGAA TTTCGCTCGCTCCAATCC	<i>arsR</i> 2310, homólogo del represor del operón de resistencia a As
ArsR3140F ArsR3140R	CCGAGTCATCCTTTGCCAAA CCAAATGCTCCCAATTGCA	<i>arsR</i> 3140, homólogo del represor del operón de resistencia a As
ArsR3676F ArsR3676R	GACTTGTGAACAGCACGCTTTG CCTTACAAGCTGCTCGTCATACTC	<i>arsR</i> 3676, homólogo del represor del operón de resistencia a As
ArsR3724F ArsR3724R	TCTGGCCATGATGCAACGT TCTGCGATAATATGTCCATTGGTT	<i>arsR</i> 3724, homólogo del represor del operón de resistencia a As



4. CAPÍTULO 2

4.3. RESULTADOS



4.3. RESULTADOS

4.3.1. Caracterización de la resistencia a metales de *Terribacillus* sp. AE2B 122

Siguiendo la línea de mejora medioambiental de este trabajo, cuya primera parte intenta minimizar las emisiones contaminantes con el uso de Biodiésel, esta segunda parte se desarrolla en el contexto de un problema actual, la contaminación ambiental por metales pesados.

En primer lugar, se realizó el estudio *in silico* de los genes relacionados con la resistencia a metales pesados y metaloides, presentes en el genoma secuenciado de la cepa *Terribacillus* sp. AE2B 122. Se seleccionaron los metales [As(V), Cr(VI), Zn, Cu(II), Co y Cd] a utilizar en los experimentos de resistencia.

Para la búsqueda de genes de resistencia se utilizó la anotación del genoma secuenciado de *Terribacillus* sp. AE2B 122. Los genes de resistencia localizados en el genoma se analizaron mediante herramientas bioinformáticas (BLAST y EXPASY) tal y como se describió en el capítulo 1.

Genes de resistencia a cromo

Se encontraron tres genes relacionados con resistencia a cromo con dominios específicos de transportadores de cromato, homólogos al transportador ChrA (Figura 53). También se encontraron 5 copias de genes homólogos de nitroreductasas que podrían poseer una doble función reductora (Figura 53). Estos genes abarcan los mecanismos mejor caracterizados de resistencia a cromato [Cr(VI)], que son la expulsión de iones cromato y la reducción de Cr(VI) a Cr(III).

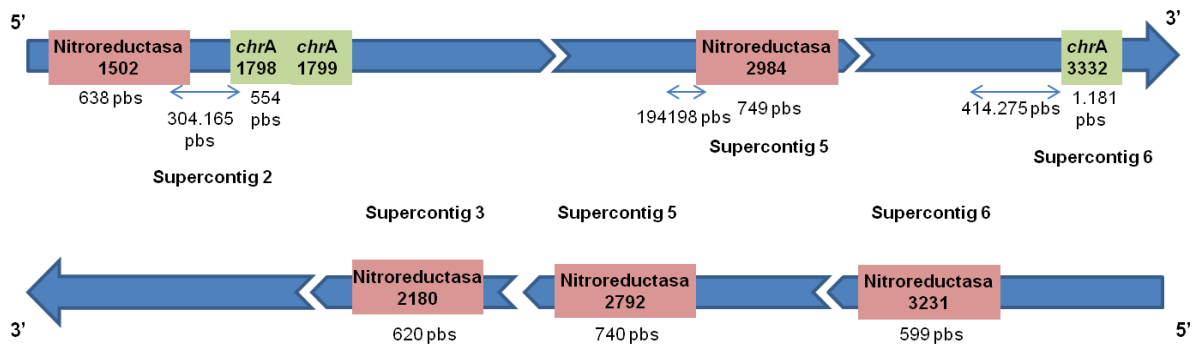


Figura 53. Esquema de la disposición de los posibles genes de resistencia a cromo de *Terribacillus* sp. AE2B 122. Se indican mediante rectángulos rosas los genes homólogos de nitroreductasas, rectángulos verdes los genes homólogos de *chrA*, en las distintas hebras del ADN. Se muestra el tamaño de los genes en número de pares bases (pbs) debajo de cada rectángulo, la distancia en número de pares de bases entre los genes sobre flechas azules y el supercontig donde se ubican en negrita. Debido a que la posición relativa de los distintos supercontings en el genoma es desconocida, la disposición de éstos mostrada en la figura es aleatoria y solo se muestra la distancia entre genes ubicados en el mismo superconting

Genes de resistencia a cobalto-zinc-cadmio

Se encontraron 4 homólogos de genes anotados como reguladores transcripcionales de respuesta a estrés, incluidos metales pesados, de la familia MER, con un dominio del regulador ZntR (regulador transcripcional de respuesta a Zn, Cd y Pb) y tres homólogos de proteínas de resistencia a Co-Zn-Cd, una de las cuales aparece anotada como CzcD, que es un miembro de la familia de transportadores facilitadores de difusión de cationes a través de la membrana plasmática. Las otras dos proteínas de resistencia son homólogas a FieF (Figura 54), que en *W. metallidurans* y *E. coli* aportan resistencia a Fe-Co-Zn-Cd-Ni (Munkelt y col., 2004).

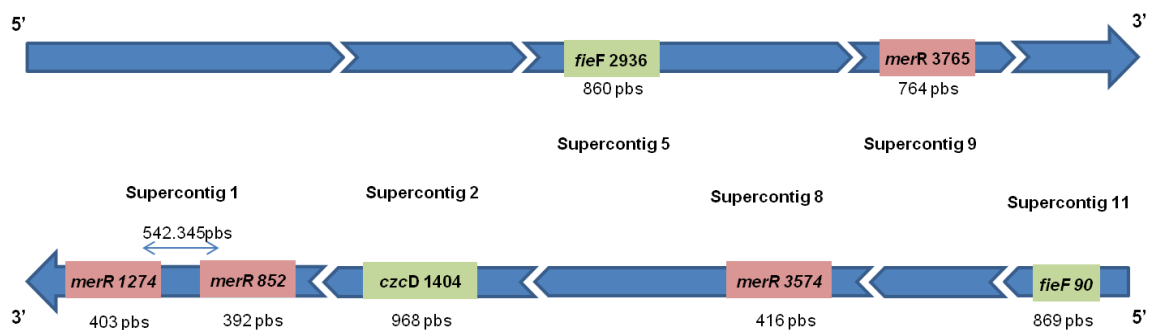


Figura 54. Esquema de la disposición de los posibles genes de resistencia a cobalto, zinc y cadmio de *Terribacillus* sp. AE2B 122. Se indican mediante rectángulos rosas los genes homólogos de reguladores transcripcionales de respuesta a estrés y en rectángulos verdes los genes homólogos de transportadores de cationes divalentes (*czcD* y *fieF*) en las distintas hebras del ADN. Se muestra el tamaño de los genes en número de pares bases (pbs) debajo de cada rectángulo, la distancia en número de pares de bases entre los genes sobre flechas azules y el supercontig donde se ubican en negrita. Debido a que la posición relativa de los distintos supercontings en el genoma es desconocida, la disposición de éstos mostrada en la figura es aleatoria y solo se muestra la distancia entre genes ubicados en el mismo superconting

Genes de resistencia a cobalto

Además de los genes mencionados relacionados con la resistencia a Co-Zn-Cd, se localizaron en el genoma varios homólogos de las proteínas CorA y CorC, las cuales se han descrito como transportadoras de Co^{+2} , Ni^{+2} y Mg^{+2} (Figura 55).

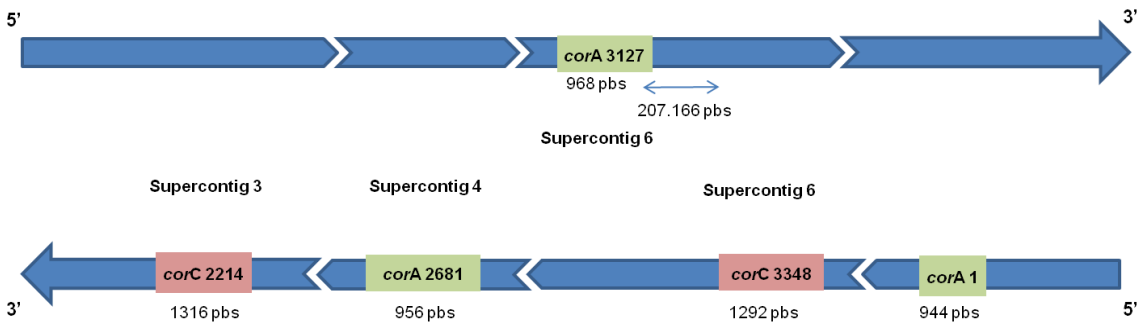


Figura 55. Esquema de la disposición de los posibles genes de resistencia a cobalto de *Terribacillus* sp. AE2B 122. Se indican mediante rectángulos rosas los genes homólogos de *corC* y en rectángulos verdes los genes homólogos de *corA*, en las distintas hebras del ADN. Se muestra el tamaño de los genes en número de pares bases (pbs) debajo de cada rectángulo, la distancia en número de pares de bases entre los genes sobre flechas azules y el supercontig donde se ubican en negrita. Debido a que la posición relativa de los distintos supercontings en el genoma es desconocida, la disposición de éstos mostrada en la figura es aleatoria y solo se muestra la distancia entre genes ubicados en el mismo superconting

Genes de resistencia a cobre

En el caso de los genes de resistencia a cobre (Figura 56), se localizaron 5 genes distintos que codificarían las siguientes proteínas: CutC; CopC; un regulador transcripcional de respuesta a Cu, Ni, sulfito y formaldehído, parecido a CsoR; una ATPasa tipo P translocadora de cobre parecida a CopA; y CopZ, una posible chaperona de cobre de la familia HMA (*Heavy Metal Associated domain*).

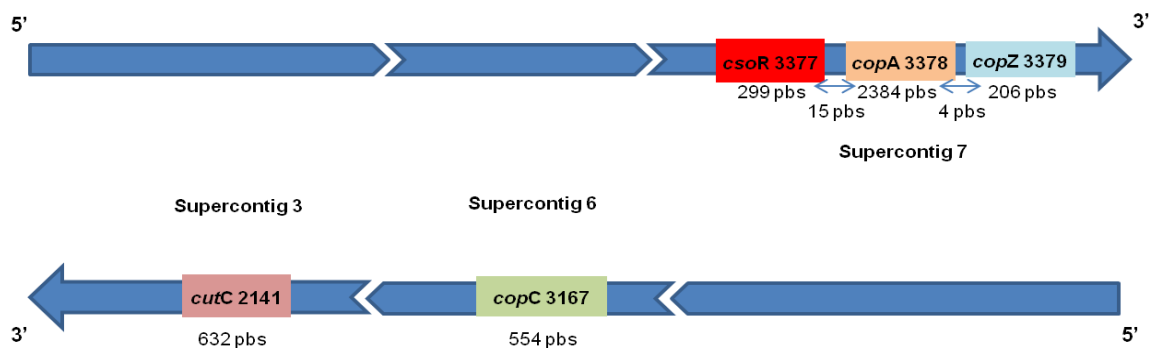


Figura 56. Esquema de la disposición de los posibles genes de resistencia a cobre de *Terribacillus* sp. AE2B 122. Se indican mediante rectángulo rosa el gen homólogo de *cutC*, en rectángulo verde el gen homólogo de *copC*, en rectángulo rojo el gen homólogo de *copR*, en rectángulo naranja el gen homólogo de *copA* y en rectángulo azul el gen homólogo de *copZ*, en las distintas hebras del ADN. Se muestra el tamaño de los genes en número de pares bases (pbs) debajo de cada rectángulo, la distancia en número de pares de bases entre los genes sobre flechas azules y el supercontig donde se ubican en negrita. Debido a que la posición relativa de los distintos supercontings en el genoma es desconocida, la disposición de éstos mostrada en la figura es aleatoria y solo se muestra la distancia entre genes ubicados en el mismo superconting

Genes de resistencia a arsénico

Se encontraron varios homólogos de los genes de resistencia a arsénico típicos (Figura 57), *arsR*, *arsB* y *arsC*. Solo un homólogo del represor ArsR y de la bomba de arsenito ArsB aparecían contiguos en el genoma de *Terribacillus* sp. AE2B, por lo que no poseían la disposición típica en operón encontrada en la mayoría de organismos con resistencia a este metal.

Se localizaron cuatro homólogos de *arsR* y todos ellos poseían el dominio conservado HTH_ARSR, presente en el represor del operón de resistencia a arsénico ArsR y en otros represores regulados por metales similares a éste que en respuesta al metal se disocian del ADN.

Para la reductasa ArsC se encontraron dos posibles genes homólogos que poseían el dominio conservado de la familia de la reductasa ArsC. Se clasificaron dentro de la superfamilia de plegamiento de las tiorredoxinas y poseían dominios de glutaredoxinas. Estos datos coinciden con lo que ya se conoce sobre esta familia de reductasas, las cuales utilizan el glutatión reducido (GSH) para reducir arseniato a arsenito mediante una cisteína redox localizada en el sitio activo (Liu & Rosen, 1997). Sin embargo, ninguna de las dos se encontraba en el mismo operón que *arsRB*.

Por último, se localizaron dos genes homólogos para la proteína transportadora ArsB. Ambas secuencias proteicas poseían el dominio conservado de la familia de permeasas ArsB y el dominio conservado de la superfamilia de permeasas ArsB_NhaD a la que pertenece esta familia de proteínas.

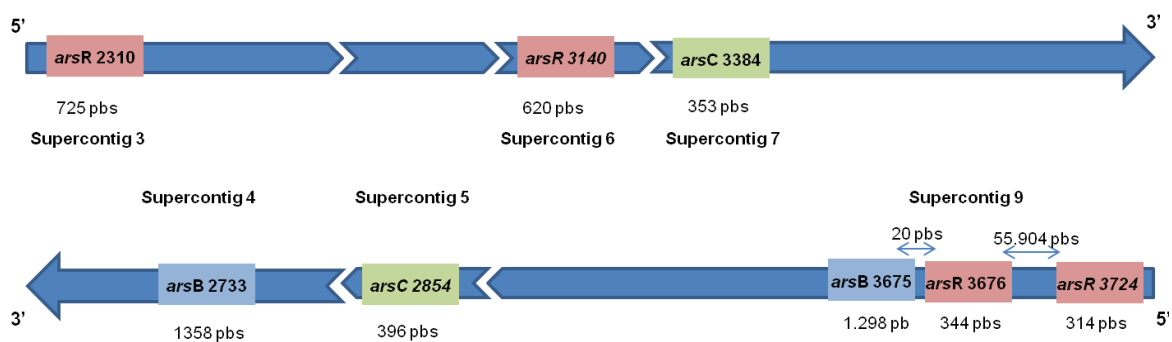


Figura 57. Esquema de la disposición de los genes *ars* de *Terribacillus* sp. AE2B 122. Se indican mediante rectángulos rosas los genes homólogos de *arsR*, rectángulos azules los genes homólogos de *arsB* y en verde los homólogos de *arsC*, en las distintas hebras del ADN. Se muestra el tamaño de los genes en número de bases (pbs) debajo de cada rectángulo, la distancia en número de bases entre los genes sobre flechas azules o rojas y el supercontig donde se ubican en negrita. Debido a que la posición relativa de los distintos supercontings en el genoma es desconocida, la disposición de éstos mostrada en la figura es aleatoria y solo se muestra la distancia entre genes ubicados en el mismo superconting

4.3.2. Análisis de la resistencia a metales en medio líquido de *Terribacillus* sp. AE2B 122

Al encontrar homólogos de varios genes de resistencia a metales en el genoma de *Terribacillus* sp. AE2B 122, se procedió a evaluar la resistencia de esta cepa a esos metales pesados. Se comprobó su crecimiento en medio PYA+1,5% NaCl con y sin fosfato (Pi), adicionado con concentraciones crecientes (0,09375; 0,375; 0,75; 1,5; 3; 6 y 12 mM) de distintos metales [As(V), Cr(VI), Zn, Cu(II), Co(II) y Cd] en placas microtiter de 96 pocillos. Las placas inoculadas se incubaron sin agitación a 30°C y se midieron las DO a 620 nm a distintas horas (0, 6, 20, 24 y 48).

Los resultados que se muestran son la media de tres réplicas experimentales independientes realizadas por duplicado. Tras analizar todos los datos a diferentes tiempos, se seleccionó las 24 h de crecimiento por ser este punto el que mostraba más claramente los efectos de cada metal en el crecimiento de *Terribacillus* sp. AE2B 122.

La disminución del crecimiento de *Terribacillus* sp. AE2B 122 a medida que aumentaba la concentración de Cr(VI), en el medio con Pi (Figura 58A), ocurrió de manera progresiva, disminuyendo el crecimiento con el aumento de concentración del metal. Cuando el ensayo se realizó en el medio sin Pi, el crecimiento no se veía afectado de manera significativa al aumentar la concentración de Cr(VI) (Figura 58B), probablemente porque el crecimiento en el medio sin Pi ya se veía afectado sin el metal.

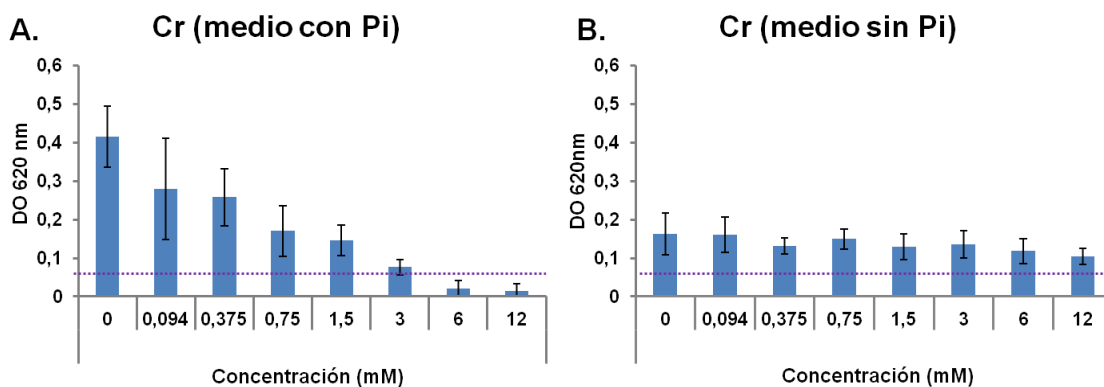


Figura 58. Crecimiento de *Terribacillus* sp. AE2B 122 en medio PYA + 1,5% NaCl con Pi (A) o sin Pi (B) y distintas concentraciones de Cr(VI) a las 24 h de cultivo. La línea de puntos marca DO inicial

En el caso del As(V), a diferencia del Cr(VI), en el medio con Pi, la disminución de la resistencia no se observó progresivamente, sino que sufre una bajada a la concentración 0,094 mM y se mantiene el crecimiento hasta la concentración de 3 mM donde se observa otra pequeña bajada (Figura 59A), manteniéndose incluso algo de crecimiento a la concentración de 12 mM. En el medio sin Pi, el crecimiento disminuye progresivamente hasta dejar de crecer a una concentración de 12 mM de As (Figura 59B), mostrando en general menor resistencia en este medio.

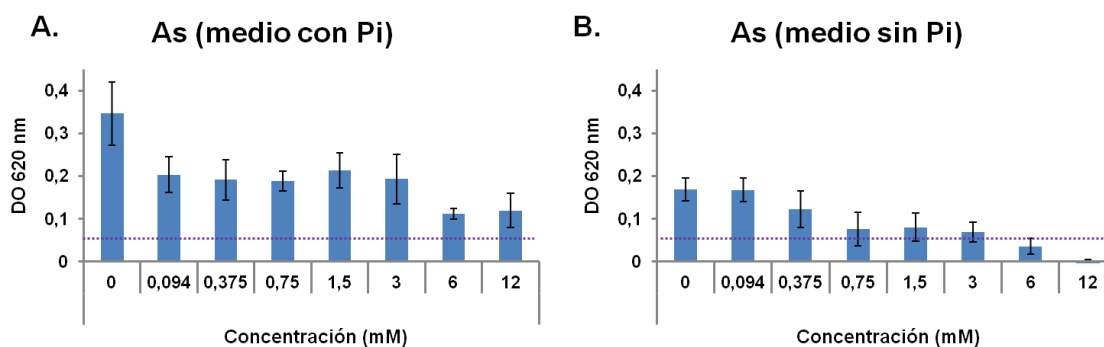


Figura 59. Crecimiento de *Terribacillus* sp. AE2B 122 en medio PYA + 1,5% NaCl con Pi (A) o sin Pi (B) y distintas concentraciones de As(V) a las 24 h de cultivo. La línea de puntos marca DO inicial

El Cd resultó tóxico para *Terribacillus* sp. AE2B 122 incluso a bajas concentraciones (0,094 mM), no mostrando resistencia a las concentraciones probadas (Figura 60).

El incremento en la DO detectado a las mayores concentraciones del metal en el medio con Pi (Figura 60A), puede deberse a la precipitación que sufre el Cd en presencia de fosfato.

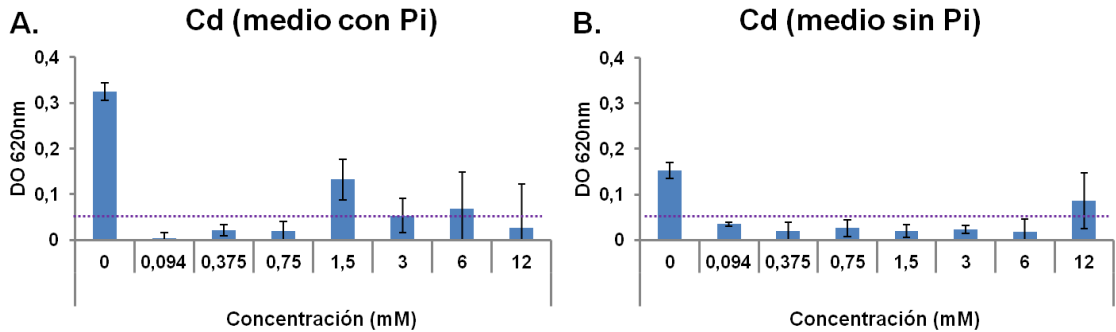


Figura 60. Crecimiento de *Terribacillus* sp. AE2B 122 en medio PYA + 1,5% NaCl con Pi (A) o sin Pi (B) y distintas concentraciones de Cd a las 24 h de cultivo. La línea de puntos marca DO inicial

En el caso del Cu(II) (Figura 61), el crecimiento no se ve afectado hasta la concentración de 3 mM en el medio con Pi (Figura 61A), disminuyendo un poco antes en el medio sin Pi (Figura 61B).

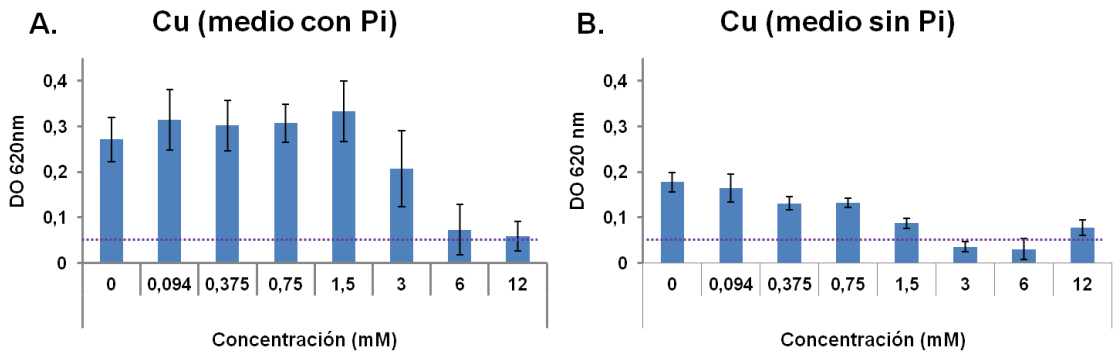


Figura 61. Crecimiento de *Terribacillus* sp. AE2B 122 en medio PYA + 1,5% NaCl con Pi (A) o sin Pi (B) y distintas concentraciones de Cu(II) a las 24 h de cultivo. La línea de puntos marca DO inicial

El efecto del Co(II) resultó ser parecido al del Cr, provocando una disminución del crecimiento progresiva, a medida que aumentaba la concentración en el medio con Pi (Figura 62A), siendo esta bajada en la resistencia menos marcada en el medio sin Pi (Figura 62B). Al igual que con el Cd, el Co en el medio con Pi generaba precipitados que entorpecían la medida de la absorbancia.

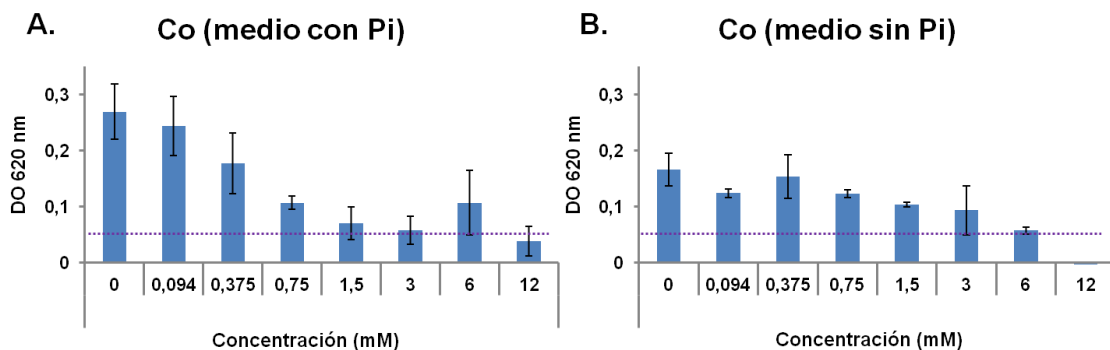


Figura 62. Crecimiento de *Terribacillus* sp. AE2B 122 en medio PYA + 1,5% NaCl con Pi (A) o sin Pi (B) y distintas concentraciones de Co a las 24 h de crecimiento. La línea de puntos marca DO inicial

En el caso del Zn, al igual que con el Cd y el Co, se produce una precipitación de Zn en el medio con Pi, donde se detectó crecimiento hasta la concentración de 0,375 mM (Figura 63A). En el medio sin Pi, donde no se produce precipitación (Figura 63B), el Zn inhibe el crecimiento de *Terribacillus* sp. AE2B 122 incluso en la concentración más baja probada (0,094 mM).

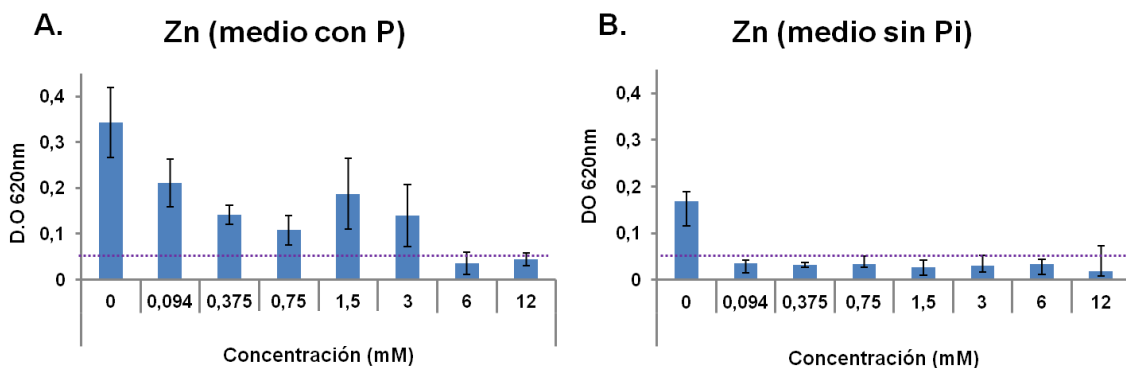


Figura 63. Crecimiento de *Terribacillus* sp. AE2B 122 en medio PYA + 1,5% NaCl con Pi (A) o sin Pi (B) y distintas concentraciones de Zn a las 24 h de crecimiento. La línea de puntos marca DO inicial

4.3.3. RT-qPCR de los genes de resistencia a arsénico de *Terribacillus* sp. AE2B 122

El análisis del genoma de *Terribacillus* sp. AE2B 122 determinó que poseía homólogos de los tres genes esenciales para la resistencia a As, el regulador/represor *arsR* (4 homólogos), la bomba de eflujo de As(III) *arsB* (2 homólogos) y la reductasa de As(V) *arsC* (2 homólogos). Estos genes se distribuían tanto en la cadena positiva, como en la negativa del genoma secuenciado de *Terribacillus* sp. AE2B 122. Además, solo *arsR3676* y *arsB3675* de la cadena positiva, se encontraban en posiciones correlativas en el genoma, resultando ser llamativa esta distribución ya que podrían formar un operón *arsRB* sin *arsC* como componente del mismo (Figura 57). Por tanto, se procedió a estudiar la regulación de la expresión de estos genes mediante RT-qPCR para determinar cuál(es) de ellos era inducible por arsénico. Para ello, la cepa *Terribacillus* sp. AE2B 122 se cultivó a 30°C y 200 rpm durante 6h en medio PYA + 1,5% de NaCl con arseniato [As (V)] a las concentraciones finales de 0 mM, 0,375 mM y 1,5 mM, utilizando como donador de arseniato la sal sódica heptahidratada del ácido arsénico.

Tanto en el caso del gen *arsR* (Figura 64) como de *arsB* (Figura 65) se observa un aumento de la expresión de los genes *arsR3676* y *arsB3675* al incrementar la concentración de As(V) en el medio de cultivo. Estos genes eran los únicos que se encuentran agrupados en un posible operón.

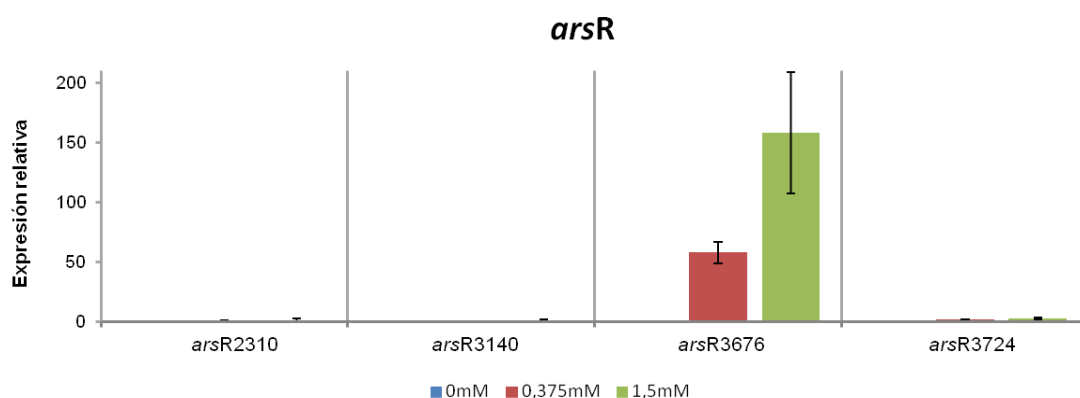


Figura 64. Expresión de los homólogos del gen *arsR* a distintas concentraciones de As(V) (0 mM, 0,375 mM y 1,5 mM), normalizada a la expresión de *gyrA* y relativizada al valor de la expresión en medio sin As(V) (0 mM) para cada gen

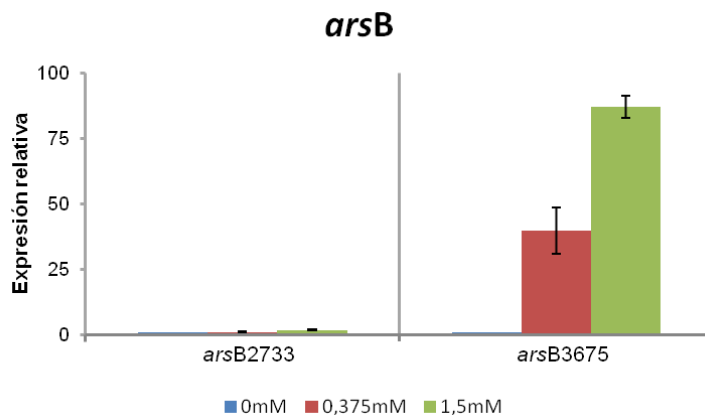


Figura 65. Expresión de los homólogos del gen *arsB* a distintas concentraciones de As(V) (0 mM, 0,375 mM y 1,5 mM), normalizada a la expresión de *gyrA* y relativizada al valor de expresión en medio sin As(V) (0 mM) para cada gen

Por el contrario, para el gen *arsC* no se observó inducción en presencia de arseniato en ninguno de los dos genes homólogos ensayados (Figura 66 B). Se procedió a representar la expresión bruta de los genes sin relativizar a la expresión en ausencia de arseniato. Se pudo observar así que la copia *arsC2854* se expresaba entre 60 y 100 veces más que *arsC3384* (Figura 66A), pero sin ser inducible en presencia de arseniato.

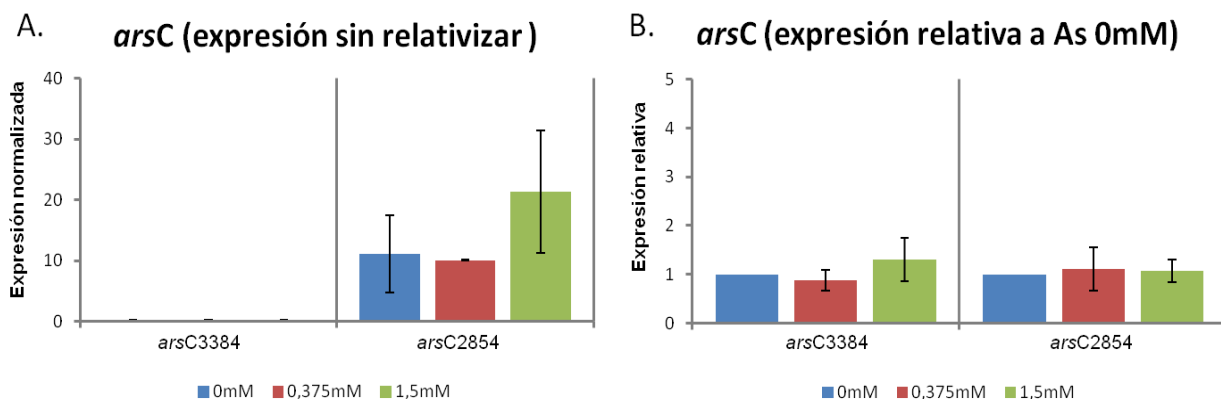


Figura 66. Expresión de los genes de *Terribacillus* sp. AE2B 122 homólogos del gen *arsC* a distintas concentraciones de As(V) (0 mM, 0,375 mM y 1,5 mM). A: normalizada a la expresión de *gyrA*; B: normalizada a la expresión de *gyrA* y relativizada al valor de expresión en medio sin As(V) (0 mM) para cada gen. Al punto 0 mM se le asigna un valor arbitrario de 1, resultante de la relativización consigo mismo

4.3.4. Expresión heteróloga de los genes *ars* de *Terribacillus* sp. AE2B 122 en *E. coli*

Con el fin de comprobar la funcionalidad de los dos genes que parecen codificar la bomba de eflujo (ArsB 2733 y 3675) y los dos genes que codifican las reductasas (ArsC 2854 y 3384) se procedió a clonarlos en distintos vectores (pVLT31 y pIZ1016) bajo el control del promotor Ptac. Las construcciones se transformaron en células competentes de la estirpe de *E. coli* AW3110, la cual es sensible a arsénico, debido a la delección del operón de resistencia a arsénico (Δ *arsRBC*) de la cepa original *E. coli* W3110.

Para acotar las concentraciones que se debían usar en el ensayo de resistencia, se realizó un experimento de crecimiento de la cepa sensible a As, *E. coli* AW310, en un único medio PYA + 1,5% NaCl + 1% de glucosa, adicionado con distintas concentraciones de As(III) y As(V). Las concentraciones seleccionadas fueron las concentraciones mayores en las que los transformantes resistentes ó *E. coli* W3110 fueron capaces de crecer y no lo hacía *E. coli* AW3110. Estas concentraciones fueron: 5 mM de As(III), 10 mM de As(V) y 15 mM de As(V). El siguiente experimento se realizó creciendo estas cepas en estas concentraciones en tres medios distintos, PYA + 1,5% NaCl adicionado con 0,01 mM de IPTG, 1 mM de IPTG, o 1% de glucosa.

En nuestras condiciones experimentales, *E. coli* AW3110 resistió hasta 0,5 mM de As(III) y 5 mM de As(V) y *E. coli* W3110 hasta 5 mM de As(III) y 100 mM de As(V).

En los medios controles sin As (Figura 67), todas las cepas crecieron bien, excepto en el medio con 1 mM de IPTG, donde los transformantes dobles y simples con los genes de las bombas *arsB*, crecieron peor, probablemente debido a un efecto tóxico de la sobreexpresión de estos genes.

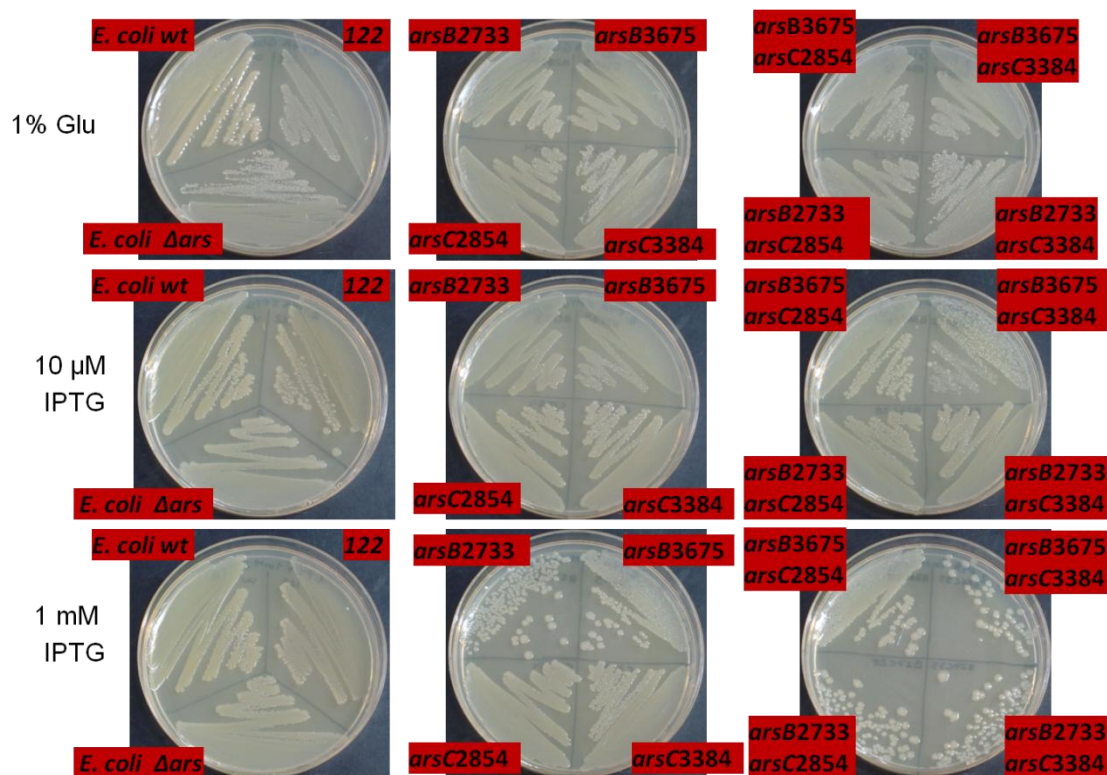


Figura 67. Fotos del crecimiento de las distintas cepas bacterianas usadas en el ensayo de arsénico, en las placas de medios control sin As(V) ni As(III). El medio usado fue PYA + 1,5% NaCl adicionado con 10 μM, 1 mM de IPTG ó 1% de Glucosa; *E. coli* wt: *E. coli* W3110; *E. coli* Δars: *E. coli* AW3110; 122: *Terribacillus* sp. AE2B 122; *arsB2733*: *E. coli* AW3110 pVLT31-*arsB2733*; *arsB3675*: *E. coli* AW3110 pVLT31-*arsB3675*; *arsC2854*: *E. coli* AW3110 pIZ1016-*arsC2854*; *arsC3384*: *E. coli* AW3110 pIZ1016-*arsC3384*; *arsB3675 arsC2854*: *E. coli* AW3110 pVLT31-*arsB3675*/pIZ1016-*arsC2854*; *arsB3675 arsC3384*: *E. coli* AW3110 pVLT31-*arsB3675*/pIZ1016-*arsC3384*; *arsB2733 arsC2854*: *E. coli* AW3110 pVLT31-*arsB2733*/pIZ1016-*arsC2854*; y *arsB2733 arsC3384*: *E. coli* AW3110 pVLT31-*arsB2733* y pIZ1016-*arsC3384*

Cuando se expusieron las cepas recombinantes de *E. coli* a 5 mM de As(III) (Figura 68), ninguno de los controles utilizados (*E. coli* W3110, *E. coli* AW3110 y *Terribacillus* sp. AE2B 122) crecieron en los medios adicionados con 1 mM de IPTG. En el medio adicionado con 10 μ M de IPTG solo se observó un poco de crecimiento residual de la cepa resistente *E. coli* W3110. En el medio adicionado con 1% de glucosa solo se apreció crecimiento de *E. coli* W3110, donde creció mucho mejor que en el medio con 10 μ M de IPTG. A pesar de que en el medio con 10 μ M de IPTG no se observó crecimiento de *Terribacillus* sp. AE2B 122 ni de *E. coli* AW3110, si se observó crecimiento de la cepa de *E. coli* AW3110 con *arsB3675* y *arsC2854*, creciendo incluso mejor que la cepa resistente *E. coli* W3110, la cual solo presentó un crecimiento residual. Tal y como ocurrió con las cepas controles, cuando al medio se le añadió 1 mM de IPTG en vez de 10 μ M, no se observó crecimiento de ningún transformante. Por el contrario, si se observó crecimiento en el medio con 1% de glucosa, donde creció, además de *E. coli* AW3110 con *arsB3675* y *arsC2854*, *E. coli* AW3110 con *arsB3675* y *arsC3384* y el transformante simple con *arsB3675*.

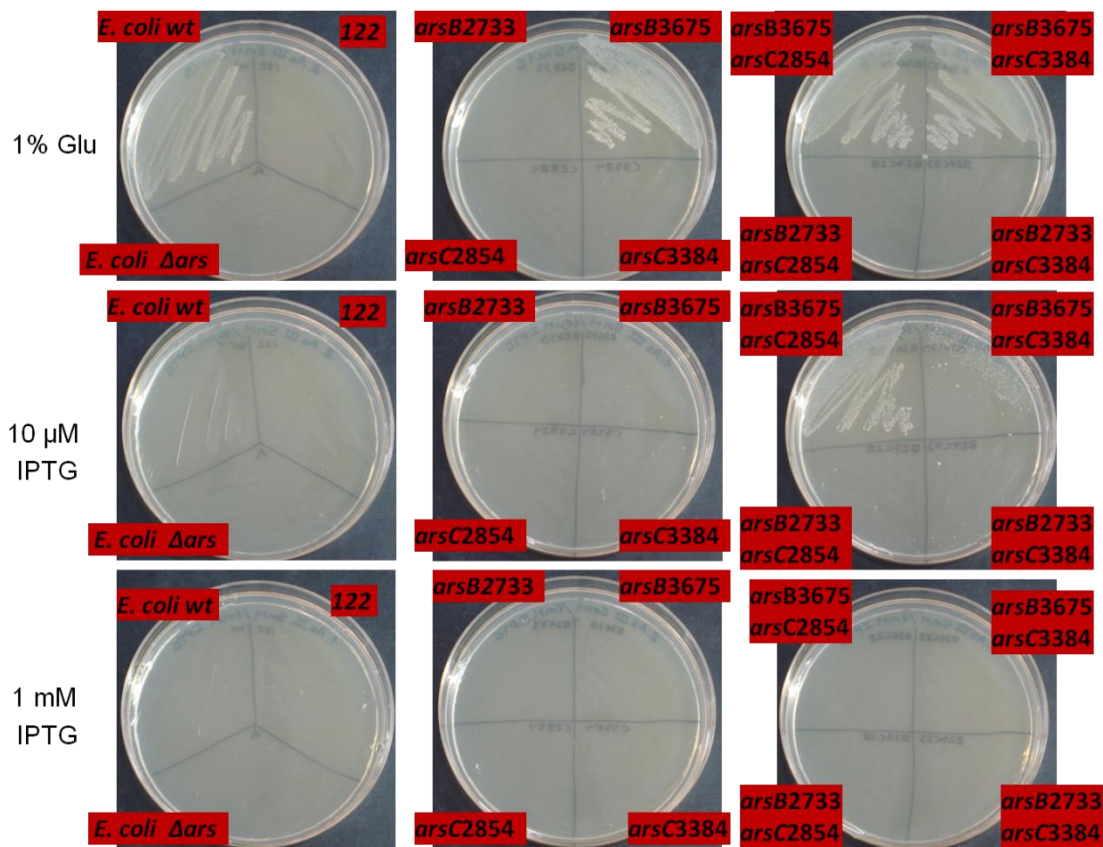


Figura 68. Fotos del crecimiento de las distintas cepas bacterianas usadas en el ensayo de arsénico, en las placas de medios con As(III) 5 mM. El medio usado fue PYA + 1,5% NaCl adicionado con 10 μ M, 1 mM de IPTG ó 1% de Glucosa y 5 mM de As(III); *E. coli* wt: *E. coli* W3110; *E. coli* Δ ars: *E. coli* AW3110; 122: *Terribacillus* sp. AE2B 122; *arsB2733*: *E. coli* AW3110 pVLT31-*arsB2733*; *arsB3675*: *E. coli* AW3110 pVLT31-*arsB3675*; *arsC2854*: *E. coli* AW3110 pIZ1016-*arsC2854*; *arsC3384*: *E. coli* AW3110 pIZ1016-*arsC3384*; *arsB3675 arsC2854*: *E. coli* AW3110 pVLT31-*arsB3675*/pIZ1016-*arsC2854*; *arsB3675 arsC3384*: *E. coli* AW3110 pVLT31-*arsB3675*/ pIZ1016-*arsC3384*; *arsB2733 arsC2854*: *E. coli* AW3110 pVLT31-*arsB2733*/pIZ1016-*arsC2854*; y *arsB2733 arsC3384*: *E. coli* AW3110 pVLT31-*arsB2733* y pIZ1016-*arsC3384*

Para estudiar la resistencia a arseniato se probaron 2 concentraciones, 10 mM y 15 mM de As(V). A 10 mM de As(V) las cepas controles *E. coli* W3110 y *Terribacillus* sp. AE2B 122 crecieron tanto en los medios adicionados con IPTG como en los adicionados con 1% de glucosa. Sin embargo, la cepa control *E. coli* AW3110 solo presentó un poco de crecimiento residual en el medio con 1% de glucosa (Figura 69).

A la concentración de 10 mM de As(V) (Figura 69) y 10 μ M de IPTG se observó crecimiento de *E. coli* AW3110 con *arsB2733* y con *arsC3384*, y crecimiento residual de

E. coli AW3110 con *arsB2733* y *arsC3384*. Por el contrario, a la concentración de 1 mM de IPTG, solo creció el *E. coli* AW3110 con la reductasa *arsC3384*. Cuando al medio se le adicionó 1% de glucosa en vez de IPTG se observó crecimiento de todos los transformantes, aunque en alguno de los casos éste crecimiento se puede considerar como residual.

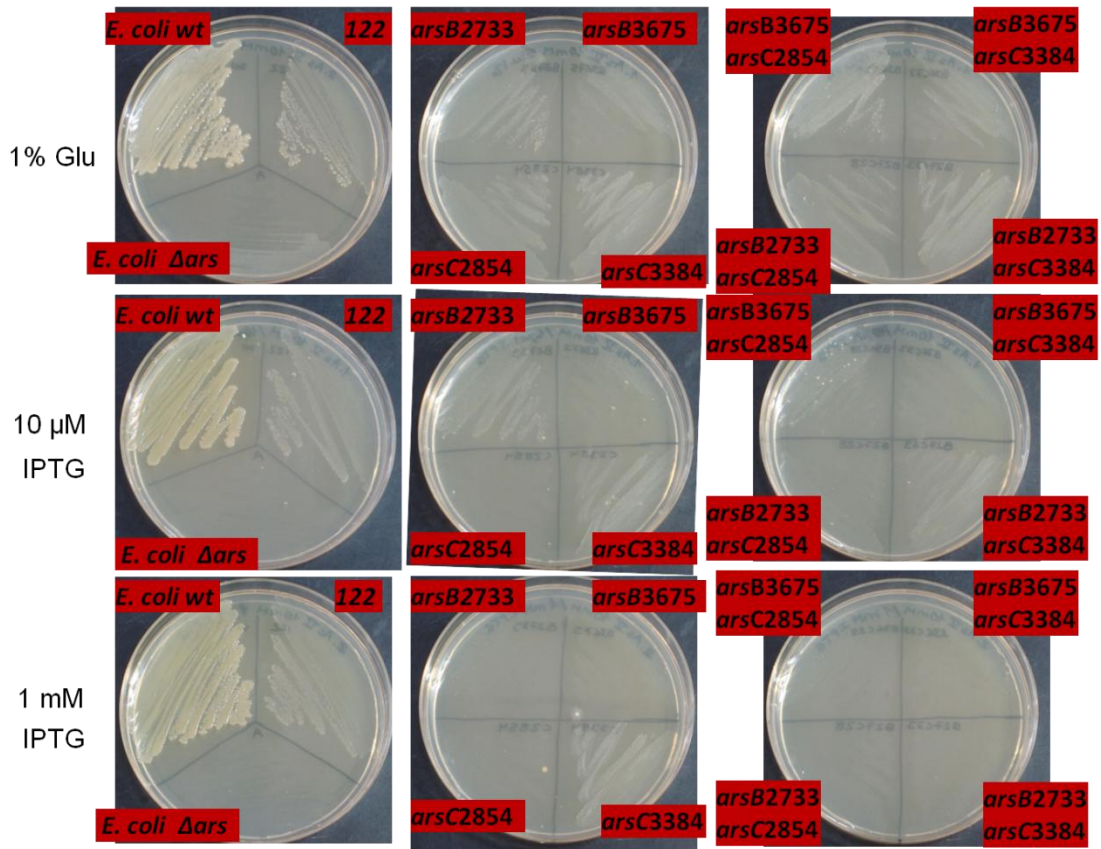


Figura 69. Fotos del crecimiento de las distintas cepas bacterianas usadas en el ensayo de arsénico, en las placas de medios con As(V) 10 mM. El medio usado fue PYA + 1,5% NaCl adicionado con 10 μM, 1 mM ó 1% de Glucosa y 10mM de As(V); *E. coli* wt: *E. coli* W3110; *E. coli* Δars: *E. coli* AW3110; 122: *Terribacillus* sp. AE2B 122; *arsB2733*: *E. coli* AW3110 pVLT31-*arsB2733*; *arsB3675*: *E. coli* AW3110 pVLT31-*arsB3675*; *arsC2854*: *E. coli* AW3110 pIZ1016-*arsC2854*; *arsC3384*: *E. coli* AW3110 pIZ1016-*arsC3384*; *arsB3675 arsC2854*: *E. coli* AW3110 pVLT31-*arsB3675*/pIZ1016-*arsC2854*; *arsB3675 arsC3384*: *E. coli* AW3110 pVLT31-*arsB3675*/pIZ1016-*arsC3384*; *arsB2733 arsC2854*: *E. coli* AW3110 pVLT31-*arsB2733*/pIZ1016-*arsC2854*; y *arsB2733 arsC3384*: *E. coli* AW3110 pVLT31-*arsB2733* y pIZ1016-*arsC3384*

Cuando se probó la concentración de 15 mM de As(V) (Figura 70), en ninguno de los tres casos (10 μ M de IPTG, 1 mM de IPTG y 1% de glucosa) creció el mutante sensible *E. coli* AW3110, al contrario que los controles *E. coli* W3110 y *Terribacillus* sp. AE2B 122 que crecieron en los tres medios. A esta concentración de As(V) el crecimiento fue menor en general que en 10 mM de As(V). A una concentración de 10 μ M de IPTG hubo un ligero crecimiento de los transformantes simples *arsB2733* y *arsC3384*, a la concentración 1 mM de IPTG solo creció debilmente el transformante *arsC3384* y con 1% de glucosa los mismos transformantes simples que con 10 μ M de IPTG (*arsB2733* y *arsC3384*) y todos los transformantes dobles, aunque *arsB3675/arsC3384* mostró un menor crecimiento; en todos los casos éste crecimiento se puede considerar como residual.

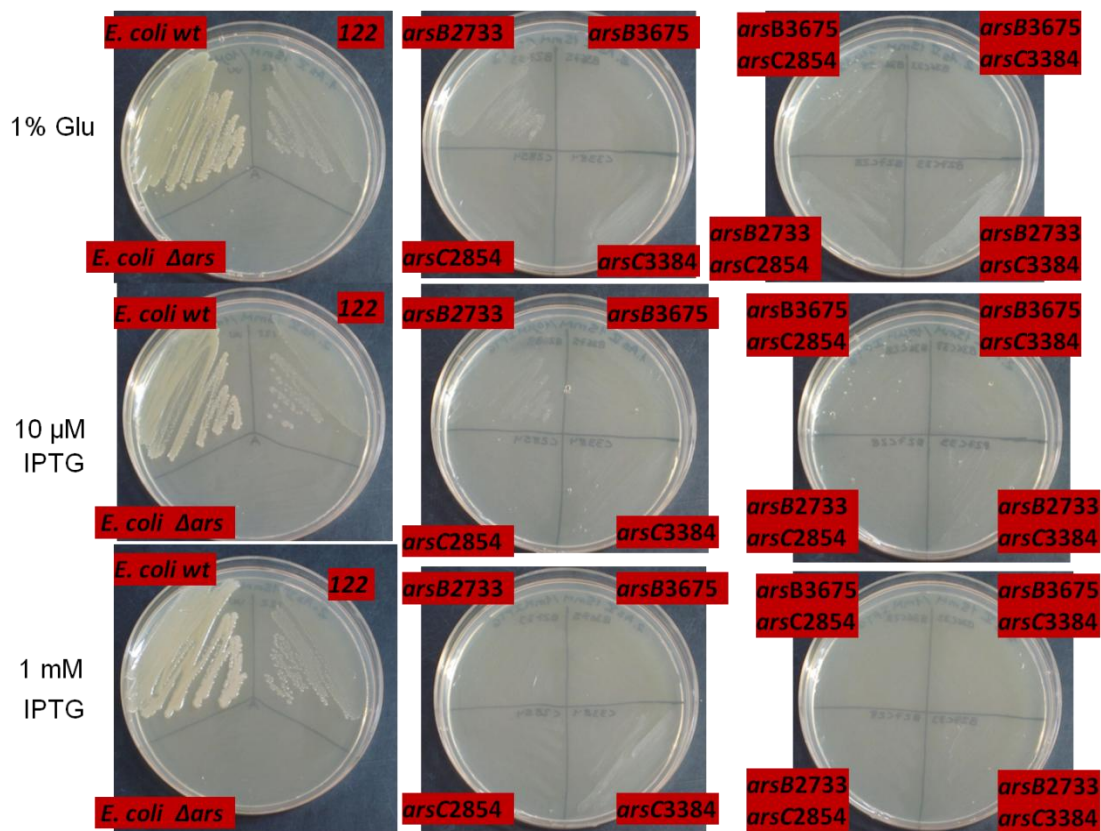


Figura 70. Fotos del crecimiento de las distintas cepas bacterianas usadas en el ensayo de arsénico, en las placas de medios con As(V) 15 mM. El medio usado fue PYA + 1,5% NaCl adicionado con 10 μM, 1 mM ó 1% de Glucosa y 15 mM de As(V); *E. coli* wt: *E. coli* W3110; *E. coli* Δars: *E. coli* AW3110; 122: *Terribacillus* sp. AE2B 122; arsB2733: *E. coli* AW3110 pVLT31-arsB2733; arsB3675: *E. coli* AW3110 pVLT31-arsB3675; arsC2854: *E. coli* AW3110 pIZ1016-arsC2854; arsC3384: *E. coli* AW3110 pIZ1016-arsC3384; arsB3675 arsC2854: *E. coli* AW3110 pVLT31-arsB3675/pIZ1016-arsC2854; arsB3675 arsC3384: *E. coli* AW3110 pVLT31-arsB3675/pIZ1016-arsC3384; arsB2733 arsC2854: *E. coli* AW3110 pVLT31-arsB2733/pIZ1016-arsC2854; y arsB2733 arsC3384: *E. coli* AW3110 pVLT31-arsB2733 y pIZ1016-arsC3384

Tras analizar todos los resultados, en el caso de la resistencia a arsenito [As(III)] la bomba ArsB3675 revierte la sensibilidad de *E. coli* AW3110 a As(III), aportándole resistencia hasta al menos 5 mM de este metaloide. En la resistencia a arsenito las reductasas no son necesarias ya que el arsenito ya se encuentra en su forma reducida.

En el caso de la resistencia a arseniato [As(V)] solo se aprecia algo de crecimiento en los transformantes simples con la reductasa ArsC3384 y la bomba ArsB2733, cuando se produce inducción de los genes con IPTG. De estos resultados nos sorprende el hecho de que se aprecie un poco de crecimiento en un transformante simple con la reductasa ArsC3384, ya que en este caso si el arsénico hubiera sido reducido a As(III) por esta reductasa, requeriría su transporte al exterior por una bomba ArsB. Sin la actuación de la bomba, el As(III) se acumularía en la célula ejerciendo su efecto tóxico.

Debido a estos resultados, se intentó analizar si el aumento de la resistencia a As(V) por expresión de la proteína ArsC3384 se debía a un efecto protector ante el estrés oxidativo producido por As(V) o su reducción a As(III), en el interior de la célula. Para esto, se crecieron los transformantes de *E. coli* AW3110 pIZ1016-arsC2854 y *E. coli* AW3110 pIZ1016-arsC3384, junto a *E. coli* AW3110 y *E. coli* W3110, en medio sólido LB conteniendo 1 mM de IPTG y concentraciones crecientes de H₂O₂ (Figura 71), con el objeto de estudiar el efecto de las reductasas en un ambiente de estrés oxidativo.

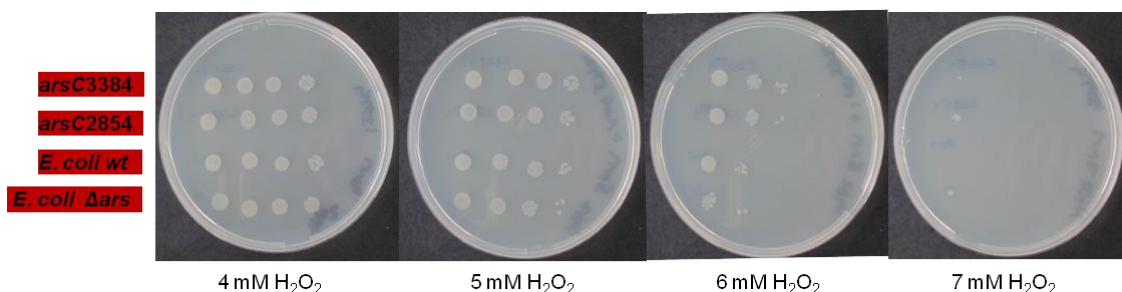


Figura 71. Fotos del crecimiento durante 24 h. Se utilizaron diluciones crecientes (10^7 , 10^6 , 10^5 y 10^4 células/ml, de izquierda a derecha) de las distintas cepas bacterianas usadas en el ensayo de estrés oxidativo. Se utilizaron placas de medio LB conteniendo H₂O₂ a distintas concentraciones (4, 5, 6 y 7 mM) y 1 mM de IPTG; *E. coli* wt: *E. coli* W3110; *E. coli* Δ ars: *E. coli* AW3110; *arsC2854*: *E. coli* AW3110 pIZ1016-arsC2854; *arsC3384*: *E. coli* AW3110 pIZ1016-arsC3384

Los resultados del ensayo con H₂O₂ mostraron un ligero aumento de la resistencia a estrés oxidativo por los transformantes simples que expresan las reductasas ArsC2854 y ArsC3384 a una concentración máxima de 6 mM (Figura 71). Este aumento de la resistencia es ligeramente mayor en el transformante simple expresando ArsC3384.



4. CAPÍTULO 2

4.4. DISCUSIÓN



4.4. Discusión

De los metales probados, *Terribacillus* sp. AE2B 122 mostró cierta resistencia a Cr(VI), As(V), Cu(II), Co(II) y Zn pero no se observó resistencia a Cd.

En el caso de los genes de resistencia a Zn, Co y Cd solo se encontraron varias copias de genes reguladores de la familia MerR, con un dominio del regulador ZntR, un homólogo del facilitador de difusión de cationes (*Cation Diffusion Facilitator*, CDF) CzcD, que en muchos organismos Gram negativos como *Alcaligenes eutrophus* pertenece al sistema *czc*, aportando resistencia a cationes divalentes (Zn^{+2} , Co^{+2} y Cd^{+2}) (Nies & Silver, 1995) y dos homólogos de FieF (CDF) que en algunos organismos como *Wautersia metallidurans* aportan resistencia a cationes metálicos divalentes (Fe^{+2} , Zn^{+2} , Co^{+2} , Cd^{+2} y Ni^{+2}) (Munkelt y col., 2004). Sin embargo, estos genes de transporte no parecen suficientes para aportar resistencia a Zn^{+2} y Cd^{+2} en *Terribacillus* sp. AE2B 122, probablemente porque estos genes suelen formar parte de sistemas de resistencia a metales en bacterias Gram negativas. En bacterias Gram positivas como *S. aureus* la resistencia a Zn^{+2} esta mediada por *czrAB* y la resistencia a Cd^{+2} mediada por *cadAC* (Kuroda y col., 1999; Lebrun y col., 1994). En *B. subtilis* la resistencia a Zn^{+2} , Cd^{+2} , Co^{+2} y Ni^{+2} está mediada por *CadA* (ATPasa de tipo P), *czcD* (CDF) y *czrA* (regulador) (Moore y col., 2005). El hecho de que se aprecie resistencia a Co^{+2} y Zn en este organismo y no a Cd^{+2} puede deberse a que los homólogos de los transportadores CzcD y FieF predominantemente aporten resistencia a Co^{+2} y Zn, tal y como ocurre en el caso de CzcD en organismos como *B. subtilis*. Además, *Terribacillus* sp. AE2B 122 también posee varias copias de las proteínas CorA y CorC, proteínas transportadoras de Mg^{+2} y Co^{+2} . En *Salmonella typhimurium* CorC es la proteína de expulsión de estos cationes, la cual confiere resistencia a Mg^{+2} y Co^{+2} , y CorA la proteína de transporte del metal al interior de la célula (Smith y col., 1998a; Sponder y col., 2010; Wang y col., 2003).

Los genes homólogos de resistencia a Cu(II) presentes en el genoma de *Terribacillus* sp. AE2B 122 son 5 y codificarían:

1. La proteína citoplasmática de eliminación de este metal homóloga a CutC, que forma parte del sistema de genes *cut*, el cual parece que interviene en la resistencia a Cu al igual que los genes *cop* (Cooksey, 1993; Gupta y col., 1995).

2. La proteína de unión a Cu(II) en el periplasma, CopC, proteína perteneciente al primer mecanismo de resistencia a Cu(II) bien caracterizado, que en *Pseudomonas* forma parte del operon *copABCD*. CopA y CopC son dos proteínas de unión a Cu(II) en el periplasma, pero solo CopA y CopB son esenciales para la resistencia a Cu(II) en este organismo (Canovas y col., 2003).
3. Un regulador transcripcional de respuesta a Cu, Ni, sulfito y formaldehído, parecido a CsoR.
4. Una ATPasa tipo P translocadora de Cu(II) que posee la misma función que CopA en *Streptococcus pneumoniae* (Fu y col., 2013b) o SilP y PacS en *Pseudomonas putida* (Canovas y col., 2003).
5. Una chaperona de Cu(II) homóloga a CopZ que se encuentra ubicada en el genoma justo después de la ATPasa de tipo P transportadora de Cu y que podría ser esencial en la resistencia a Cu(II), tal y como ocurre en *Streptococcus pneumoniae* (Figura 72) con la chaperona CupA, que junto al represor CopY y la ATPasa de tipo P, CopA aportan resistencia a este metal (Fu y col., 2013b).

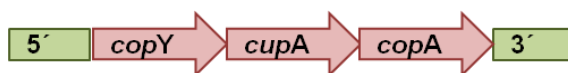


Figura 72. Operon de resistencia a cobre en *Streptococcus pneumoniae*, donde *copY* codifica un gen regulador, *cupA* codifica una chaperona y *copA* codifica una ATPasa de tipo P

Además existen varias copias de reguladores de la familia MER, que podrían cumplir el mismo papel regulador de CueR en *E. coli* (Rensing & Grass, 2003). Todos los sistemas de resistencia a cobre poseen un control homeostático y de expulsión de Cu(II) y una proteína citoplasmática que protege del daño oxidativo. Los genes presentes en *Terribacillus* sp. AE2B 122 son suficientes para aportar resistencia hasta al menos 3 mM de este metal, que comparado con la resistencia de otros organismos a Cu(II), es elevada (Altimira y col., 2012).

Aunque queda por verificar cuales de los genes mencionados son los responsables de esta resistencia, es de esperar que los genes homólogos a *csuR* (regulador), *copA* (ATPasa de tipo P) y *copZ* (chaperona), que aparecen contiguos en el genoma de *Terribacillus* sp. AE2B 122 (Figura 56 y 73), formen un operón responsable de esta resistencia, al igual que ocurre en *S. pneumoniae*.

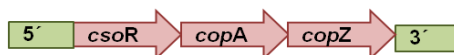


Figura 73. Posible operón de resistencia a Cu en *Terribacillus* sp. AE2B 122 compuesto por un homólogo del regulador *csuR*, un homólogo a la ATPasa de tipo P *copA* y un homólogo de la chaperona *copZ*.

Con respecto a los genes de resistencia a Cr(VI), *Terribacillus* sp. AE2B 122 posee el transportador de expulsión de Cr(VI) *ChrA* y nitrorreductasas que podrían detoxificar el cromato mediante su reducción. Estos genes abarcan los dos mecanismos mejor caracterizados de detoxificación de iones cromato (Ramírez-Díaz y col., 2008). Esta doble función de las nitrorreductasas ya se ha descrito para otras enzimas de este tipo como *NfsA/NfsB* de *E. coli* (Ackerley y col., 2004a). Quedaría por elucidar si ambos mecanismos están actuando en la resistencia al Cr(VI) o solo es activo uno de ellos. Es interesante destacar la existencia en el genoma de *Terribacillus* sp. AE2B 122 de un regulador transcripcional de la familia TetR/AcrR, contiguo a uno de los genes homólogos a *chrA* (*chrA* 3332). Esta familia interviene en la regulación de muchos procesos de resistencia a estrés, como la activación de bombas de eliminación de drogas (Deng y col., 2013; Ramos y col., 2005).

Los genes de resistencia a arsénico suelen co-transcribirse, encontrándose en una gran variedad de configuraciones génicas. La combinación mínima de genes en un operón es generalmente *arsRBC* (ej.: *E. coli*, *P. fluorescens*, *Staphylococcus*) (Figura 74A) y la más compleja, la combinación *arsRDABC* (ej.: *E. coli*, *Acidophulus multivurum*) (Figura 74B), donde *ArsD* es un componente regulador, al igual que *ArsR*, y *ArsA* es una ATPasa que aporta energía a *ArsB* para la expulsión de As(III) (Escudero y col., 2013; Tsai y col., 2009). Existen otras muchas disposiciones de los genes *ars*, como la encontrada en *Acidithiobacillus ferrooxidans*, donde los genes *ars* se encuentran en dos operones divergentes, *arsRC* y *arsBH* (Figura 74C). En este caso, *ArsH* no es necesario para la resistencia en *A. ferrooxidans*.

Por el contrario, la proteína ArsH en el plásmido de virulencia de *Yersinia* resultó esencial para la resistencia completa. En *P. putida* y *P. aeruginosa*, a diferencia del caso anterior, todos los genes del operón *arsRBCH* (Figura 74D) se co-transcriben juntos (Paez-Espino y col., 2015; Páez-Espino y col., 2009).

En el caso de *Terribacillus* sp. AE2B 122 el gen homólogo para la reductasa de As(V), *arsC* no se localiza en el genoma junto a ninguno de los otros genes responsables de la resistencia a arsénico (*arsB* y *arsR*) (Figura 57). Esto puede deberse a una adquisición independiente tanto del operón *arsRB* como del resto de genes homólogos de *arsC*, *arsB* y *arsR* distribuidos independientes en el genoma de este organismo (Ordonez y col., 2005). Esta hipótesis coincidiría con la existencia de organismos que carecen de *arsC* y que solo poseen el operón *arsRB* (Figura 74E), como es el caso de *Ferroplasma acidarmanus* Fer1 y *Picrophilus torridus* (Baker-Austin y col., 2007). El hecho de que exista más de una copia de los genes responsables de la resistencia a arsénico con distintas distribuciones en el genoma ya ha sido descrito en organismos como *Corynebacterium glutamicum*, pero siempre tenían al menos una copia del operón *arsRBC* (Ordonez y col., 2005).

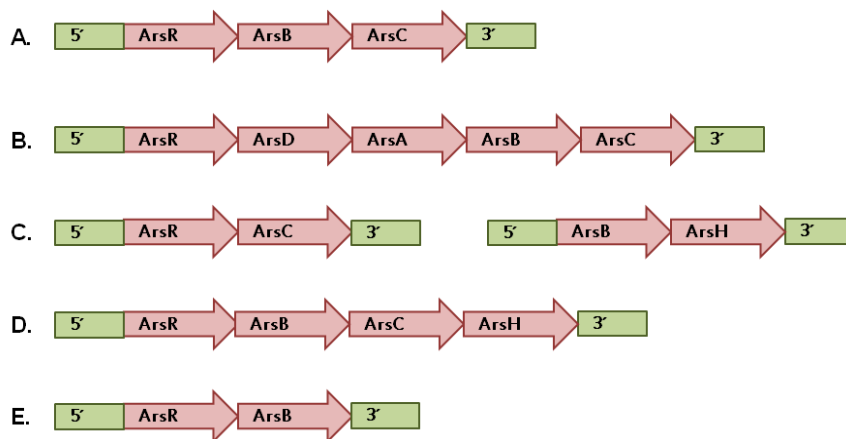


Figura 74. Ejemplo de distintas organizaciones de los genes del operón *ars*. A: *E. coli*; B: *Acidophulus multivurum*; C: *Acidithiobacillus ferrooxidans*; D: *P. aeruginosa*; y E: *Ferroplasma acidarmanus* Fer1

El análisis de la expresión de estos genes mostró que la expresión de los genes *arsB3675* y *arsR3676*, que se localizan contiguos en el genoma de la cepa estudiada, era inducible por As(V), lo que no ocurre en otros organismos como *E. coli*, donde solo As(III) es capaz de inducir la expresión del operón *ars* (Baker-Austin y col., 2007). Por el contrario, ninguna de las copias de los genes *arsC* mostró esta inducción de su expresión, lo que no nos resultó sorprendente ya que no estaban localizados junto a ninguno de los otros genes *ars* en el genoma.

Comparando los datos de expresión de cada gen *ars* de *Terribacillus* sp. AE2B 122 con los datos de complementación heteróloga del mutante *E. coli* AW3110 con estos genes, era de esperar que la sensibilidad a As(III) del mutante fuera complementada por la bomba de As(III) *arsB3675*, que además fue la única de las bombas que presentó inducción por As(V). Por el contrario, en los ensayos de resistencia a As(V) con inhibición con 1% de glucosa, cualquiera de las combinaciones de los genes *arsC* y *arsB*, reducía en cierta medida la sensibilidad del mutante al metal, permitiendo solo un crecimiento residual. Esto puede deberse a que las reductasas actúen de forma coordinada, por lo que por separado no producirían una reducción eficiente, permaneciendo parte del As(V) en la célula ejerciendo su efecto tóxico. Por el contrario, cuando añadimos As(III) eliminamos el factor limitante de la reducción parcial, siendo la bomba de As(III) *arsB3675* la principal responsable de su expulsión de la célula. Estos resultados coinciden con lo descrito en *Corynebacterium glutamicum*, donde las copias de los genes *arsC* y *arsB* que se ubicaban individualmente en el genoma, sin formar parte de un operón, tenían una expresión constitutiva y no eran los genes claves en la resistencia a arsénico en este organismo (Ordóñez y col., 2005). Otra posibilidad es que exista un problema con el nivel de expresión de las reductasas en nuestras condiciones experimentales, en las que la expresión de las bombas requiere la presencia de un inhibidor de la expresión de los plásmidos pVLT31 y pIZ1016 como es la glucosa, o de una concentración mínima de IPTG (10 μ M), para que su expresión no fuera tóxica para la célula. Esta baja expresión requerida por las bombas puede no ser suficiente para una actividad eficiente de las reductasas, lo que llevaría a una acumulación de As(V) en la célula.

Una última hipótesis para la falta de complementación de la sensibilidad a As(V) de *E. coli* AW3110 es la posibilidad de que ninguna de las reductasas analizadas funcionen como tal, ni ArsB 2733 sea una bomba de As(III); por lo tanto, la resistencia a As(V) de *Terribacillus* sp. AE2B 122 se podría deber a otro mecanismo de resistencia no relacionado con la reducción, como unos transportadores de fosfato más específicos con menos afinidad por el arseniato, su unión a chaperonas en el espacio intracelular, la eliminación directa del As(V) sin reducir, o respuesta a estrés oxidativo (Baker-Austin y col., 2007).

Esta última hipótesis concuerda con los resultados en los que los transformantes simples de *E. coli* AW3110 expresando *arsC3384* y *arsB2733* aportan un cierto nivel de resistencia a As(V), sin necesidad de la actuación conjunta de una reductasa de As(V) y una bomba de eliminación de As(III). En este contexto, ArsB2733 podría estar transportando al exterior celular As(V) directamente sin reducir y ArsC3384 podría estar ejerciendo un papel protector frente a estrés oxidativo. Al analizar más profundamente las secuencias de las reductasas (*ArsC3384* y *ArsC2854*) se apreció que ambas poseían un dominio de plegamiento de Trx (tioredoxina) y un dominio Spx (regulador transcripcional). El regulador Spx es un regulador global con gran similitud a ArsC, siendo una de sus funciones activar la transcripción de los genes de respuesta a estrés oxidativo, como sería la tioredoxina (Reder y col., 2008; Zuber, 2004). La tioredoxina protege del daño oxidativo mediante la oxidación reversible de los grupos ditiol de las proteínas dianas. Adicionalmente, los genes adyacentes a *arsC3384* en el genoma de *Terribacillus* sp. AE2B 122 corresponden a un homólogo de la proteína H del sistema de corte de la glicina (gen 3385), una endonucleasa de maduración del ARN ribosómico 5S (gen 3386) y una tioredoxina del grupo I (gen 3387). El sistema de corte de la glicina interviene en la protección frente a estrés oxidativo debido probablemente a la generación de poder reductor ($\text{NADH}^+ + \text{H}^+$) producido por la propia reacción que lleva a cabo (Figura 75) y por la acción de la lipoamida, compuesto que permanece unido covalentemente a la proteína H de este sistema de corte y que ha sido descrito como agente antioxidante y quelante de metales (Roy & Packer, 1998). Es interesante destacar que existen datos que demuestran un ligero aumento de la expresión de la proteína H de corte de la glicina tras la exposición a un exceso de Cu^{+2} en la leguminosa *Phaseolus vulgaris* (Cuypers y col., 2005).



Figura 75. Esquema de la reacción llevada a cabo por el sistema de corte de la glicina

Por último, otra posible hipótesis para la actividad de las reductasas ArsC de *Terribacillus* sp. AE2B 122 es el secuestro de arsénico por glutatión (GSH), debido a la existencia de un dominio de la proteína glutarredoxina en las secuencias de ambas reductasas (Maciaszczyk-Dziubinska y col., 2012).

Esta hipótesis de protección frente a estrés oxidativo concuerda con nuestros últimos resultados (Figura 71), en los que los transformantes simples de *E. coli* AW3110 expresando *arsC3384* y *arsC2854* muestran una ligera resistencia durante el crecimiento en un medio que contiene un compuesto generador de estrés oxidativo (H₂O₂).

❧

5. CONCLUSIONES

❧

5. CONCLUSIONES

1. Se ha desarrollado y patentado un método de selección de microorganismos productores de Biodiésel en tres pasos, el cual permitió la selección eficiente de sobrenadantes de microorganismos capaces de producir etanolisis 1,3 selectiva de aceite de girasol. Así se produce un Biofuel que integra el glicerol en su composición, con rendimientos que superan el 90% de producción de FAEs. De esta forma, se evita la separación del glicerol del producto final y la necesidad de la purificación de la enzima utilizada en la reacción, abaratando el proceso.
2. Utilizando esta metodología, se aislaron una gran diversidad de colonias productoras de halo de hidrólisis de tributirina (microorganismos lipolíticos), incluyendo 291 bacterias, 489 levaduras y 236 hongos, de una Almazara de Écija “Cooperativa Agropecuaria Industrial” (CAPI).
3. Dos cepas del género *Terribacillus* (AE2B 122 y AE1B 21) presentaron los mejores resultados en producción de Biofuel, siendo este trabajo la primera evidencia de este género como productor de Biofuel.
4. La actividad transesterificadora de *Terribacillus* sp. AE2B 122 se detectó en el sobrenadante y no era inducible por tributirina.
5. Se ha obtenido la secuencia completa del genoma de *Terribacillus* sp. AE2B 122. Tras el análisis bioinformático de este genoma se han identificado 8 lipasas/esterasas. De ellas, Tel7 es la única de las candidatas que ha mostrado cierta actividad transesterificadora frente a pNPP, tras su sobreexpresión en *E. coli* BIVU111, a pesar de no haberse conseguido una sobreexpresión óptima de la misma.
6. Mediante métodos proteómicos y bioquímicos se ha identificado una nueva α/β hidrolasa-6 en el sobrenadante de *Terribacillus* sp. AE2B 122 (Tel9) con actividad hidrolítica sobre el sustrato MUF-butirato. Esta enzima es la única lipasa que se ha localizado en el secretoma de esta bacteria.
7. Estudios de resistencia a metales han mostrado que bajo nuestras condiciones experimentales *Terribacillus* sp. AE2B 122 es moderadamente resistente a 4 metales pesados, Cr(VI) (hasta 1,5 mM), As(V) (hasta 6 mM), Cu(II) (hasta 3 mM), Co (hasta 0,75 mM) y Zn (hasta 0,375 mM) en medio líquido PYA + 1,5% NaCl.

8. Mediante el análisis del genoma de *Terribacillus* sp. AE2B 122 se han encontrado ocho genes con homología a los tres genes descritos como responsables de la resistencia a arsénico; el regulador *arsR* (4 homólogos), la bomba de eflujo de As(III) *arsB* (2 homólogos) y la reductasa de As(V) *arsC* (2 homólogos).
9. Los genes homólogos a *arsR* (*arsR3676*) y a *arsB* (*arsB3675*) se encuentran contiguos en el genoma y son inducibles por As(V), pudiendo formar un operón.
10. El gen que codifica la bomba *ArsB3675* en *Terribacillus* sp. AE2B 122 complementa la delección del gen *arsB* en *E. coli* AW3110, revirtiendo la sensibilidad de esta cepa a As(III) hasta una concentración de al menos 5 mM de este compuesto. La inducción de la expresión de las bombas *ArsB* de *Terribacillus* sp. AE2B 122 en *E. coli* AW3110 provoca un efecto negativo en su crecimiento.
11. La función de los genes homólogos a la reductasa *arsC* de *Terribacillus* sp. AE2B 122 no parece estar relacionada con la reducción de As(V) a As(III), pudiendo ejercer simplemente una función de protección frente al estrés oxidativo producido por la acumulación de este metal en la célula.

❧

6. BIBLIOGRAFÍA

❧

6. Bibliografía

- Ackerley DF, Gonzalez CF, Keyhan M, Blake R, Matin A. 2004a. Mechanism of chromate reduction by the *Escherichia coli* protein, NfsA, and the role of different chromate reductases in minimizing oxidative stress during chromate reduction. *Environ Microbiol* 6: 851-60
- Ackerley DF, Gonzalez CF, Park CH, Blake R, Keyhan M, Matin A. 2004b. Chromate-reducing properties of soluble flavoproteins from *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 70: 873-82
- Akatsuka H, Kawai E, Omori K, Komatsubara S, Shibatani T, Tosa T. 1994. The *lipA* gene of *Serratia marcescens* which encodes an extracellular lipase having no N-terminal signal peptide. *J Bacteriol* 176: 1949-56
- Alburquerque JA, Gonzalvez J, Garcia D, Cegarra J. 2004. Agrochemical characterisation of "alperujo", a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresour Technol* 91: 195-200
- Alburquerque JA, Gonzalvez J, Garcia D, Cegarra J. 2006. Measuring detoxification and maturity in compost made from "alperujo", the solid by-product of extracting olive oil by the two-phase centrifugation system. *Chemosphere* 64: 470-7
- Altimira F, Yanez C, Bravo G, Gonzalez M, Rojas LA, Seeger M. 2012. Characterization of copper-resistant bacteria and bacterial communities from copper-polluted agricultural soils of central Chile. *BMC Microbiol* 12: 193-205
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, et al. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-402
- Allen DA, Austin B, Colwell RR. 1983. *Aeromonas media*, a New Species Isolated from River Water *Int J Syst Bacteriol* 33: 599-604
- Amada K, Haruki M, Imanaka T, Morikawa M, Kanaya S. 2000. Overproduction in *Escherichia coli*, purification and characterization of a family I.3 lipase from *Pseudomonas* sp. MIS38. *Biochim Biophys Acta* 1478: 201-10
- An SY, Asahara M, Goto K, Kasai H, Yokota A. 2007. *Terribacillus saccharophilus* gen. nov., sp. nov. and *Terribacillus halophilus* sp. nov., spore-forming bacteria isolated from field soil in Japan. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 51-55
- Aransiola EF, Ojumu TV, Oyekola OO, Madzimbamuto TF, Ikhu-Omoregbe DIO. 2014. A review of current technology for biodiesel production: State of the art. *Biomass Bioenerg* 61: 276-97
- Arpigny JL, Jaeger KE. 1999. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem J* 343 Pt 1: 177-83
- Ash C, Farrow JAE, Wallbanks S, Collins MD. 1991. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small subunit ribosomal RNA sequences. *Lett Appl Microbiol* 13: 202-06
- Atabani AE, Silitonga AS, Badruddina IA, Mahliaa TMI, Masjukia HH, Mekhilefd S. 2012. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. *Renew Sust Energ Rev* 16: 2070-93
- Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, et al. 2008. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* 9: 75
- Bachmann BJ. 1987. Derivations and Genotypes of Some Mutant Derivatives of *Escherichia coli* K-12 In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*, ed.

- FC Neidhardt, JL Ingraham, KB Low, B Magasanik, M Schaechter, HE Umbarger, pp. 1190-219. Washington, D.C.: American Society for Microbiology
- Bajaj A, Lohan P, Jha PN, Mehrotra R. 2010. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. *J Mol Catal B-Enzym* 62: 9-14
- Bajpai D, Tyagi VK. 2006. Biodiesel: Source, Production, Composition, Properties and Its Benefits. *J. Oleo Sci.* 55: 487-502
- Baker-Austin C, Dopson M, Wexler M, Sawers RG, Stemmler A, et al. 2007. Extreme arsenic resistance by the acidophilic archaeon '*Ferroplasma acidarmanus*' Fer1. *Extremophiles* 11: 425-34
- Basri M, Heng AC, Razak CAN, Wan Yunus WMZ, Ahmad M, et al. 1997. Alcoholysis of palm oil mid-fraction by lipase from *Rhizopus rhizopodiformis*. *J Am Oil Chem Soc* 74: 113-16
- Bassegoda A, Pastor FI, Diaz P. 2012. *Rhodococcus* sp. strain CR-53 LipR, the first member of a new bacterial lipase family (family X) displaying an unusual Y-type oxyanion hole, similar to the *Candida antarctica* lipase clan. *Appl Environ Microbiol* 78: 1724-32
- Bayer S, Kunert A, Ballschmiter M, Greiner-Stoeffele T. 2010. Indication for a new lipolytic enzyme family: isolation and characterization of two esterases from a metagenomic library. *J Mol Microbiol Biotechnol* 18: 181-7
- Bouvet PJM, Grimont PAD. 1986. Taxonomy of the Genus *Acinetobacter* with the Recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov. *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov. *Acinetobacter johnsonii* sp. nov. and *Acinetobacter junii* sp. nov. and Emended Descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwofii*. *Int J Syst Bacteriol* 36: 228-40
- Branza-Nichita N, Negroiu G, Petrescu AJ, Garman EF, Platt FM, et al. 2000. Mutations at critical N-glycosylation sites reduce tyrosinase activity by altering folding and quality control. *J Biol Chem* 275: 8169-75
- Brault G, Shareck F, Hurtubise Y, Lepine F, Doucet N. 2012. Isolation and characterization of EstC, a new cold-active esterase from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *PLoS One* 7: e32041
- Braun P, Tommassen J, Filloux A. 1996. Role of the propeptide in folding and secretion of elastase of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 19: 297-306
- Brisou J, Prevot AR. 1954. Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under *Acromobacter* group. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 86: 722-8
- Brockerhoff H, Jensen RG. 1974. *Lipolytic enzymes*. Academic Press.
- Cai J, Xie Y, Song B, Wang Y, Zhang Z, Feng Y. 2011. *Fervidobacterium changbaicum* Lip1: identification, cloning, and characterization of the thermophilic lipase as a new member of bacterial lipase family V. *Appl Microbiol Biotechnol* 89: 1463-73
- Cain JA, Solis N, Cordwell SJ. 2014. Beyond gene expression: the impact of protein post-translational modifications in bacteria. *J Proteomics* 97: 265-86
- Camacho F, Robles A, Gonzalez PA, Camacho B, Esteban L, Molina E. 2006. Mechanistic model for the lipase-catalyzed alcoholysis of triacylglycerols. *Appl Catal A* 301: 158-68
- Canovas D, Cases I, de Lorenzo V. 2003. Heavy metal tolerance and metal homeostasis in *Pseudomonas putida* as revealed by complete genome analysis. *Environ Microbiol* 5: 1242-56
- Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B. 2009. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res* 37: D233-8

- Carlin A, Shi W, Dey S, Rosen BP. 1995. The *ars* operon of *Escherichia coli* confers arsenical and antimonial resistance. *J Bacteriol* 177: 981-6
- Cavet JS, Borrelly GP, Robinson NJ. 2003. Zn, Cu and Co in cyanobacteria: selective control of metal availability. *FEMS Microbiol Rev* 27: 165-81
- Cervantes C, Campos-Garcia J, Devars S, Gutierrez-Corona F, Loza-Tavera H, et al. 2001. Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiol Rev* 25: 335-47
- Cooksey DA. 1993. Copper uptake and resistance in bacteria. *Mol Microbiol* 7: 1-5
- Cowan ST, Steel KJ. 1985. *Manual para la identificación de bacterias de importancia médica*. pp. 320. Continental.
- Cruz H, Perez C, Wellington E, Castro C, Servin-Gonzalez L. 1994. Sequence of the *Streptomyces albus* G lipase-encoding gene reveals the presence of a prokaryotic lipase family. *Gene* 144: 141-2
- Cuypers A, Koistinen KM, Kokko H, Karenlampi S, Auriola S, Vangronsveld J. 2005. Analysis of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins affected by copper stress. *J Plant Physiol* 162: 383-92
- Cha JS, Cooksey DA. 1991. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by periplasmic and outer membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 8915-9
- Chahinian H, Ali YB, Abousalham A, Petry S, Mandrich L, et al. 2005. Substrate specificity and kinetic properties of enzymes belonging to the hormone-sensitive lipase family: comparison with non-lipolytic and lipolytic carboxylesterases. *Biochim Biophys Acta* 1738: 29-36
- Chardin B, Dolla A, Chaspoul F, Fardeau ML, Gallice P, Bruschi M. 2002. Bioremediation of chromate: thermodynamic analysis of the effects of Cr(VI) on sulfate-reducing bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 60: 352-60
- Chattopadhyay AN, Dey A, Roy P, Chatterjee S, Saha P, Mukhopadhyay SK. 2014. Cold Active Extracellular Hydrolytic Enzyme Producing Culturable Heterotrophic Bacteria from NY-ÅLESUND, Arctic. *IJBR* 5: 271-78
- Chen JW, Wu WT. 2003. Regeneration of immobilized *Candida antarctica* lipase for transesterification. *J Biosci Bioeng* 95: 466-9
- Cheunga KH, Gu J-D. 2007. Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: A review. *Int Biodeter Biodegr* 59: 8-15
- Chirino Chace, Pilar B. 2009. *Estudio funcional de la vía de degradación de 2-aminofenol presente en Burkholderia xenovorans LB400 y sus posibles aplicaciones en biotecnología ambiental*. Universidad de Chile, Valparaíso, Chile. 72 pp.
- Choudhury R, Srivastava S. 2001. Zinc resistance mechanisms in bacteria. *Curr Sci India* 81: 768-75
- de la Fuente C, Clemente R, Bernal MP. 2008. Changes in metal speciation and pH in olive processing waste and sulphur-treated contaminated soil. *Ecotoxicol Environ Saf* 70: 207-15
- de Lorenzo V, Eltis L, Kessler B, Timmis KN. 1993a. Analysis of *Pseudomonas* gene products using *lacIq/Ptrp-lac* plasmids and transposons that confer conditional phenotypes. *Gene* 123: 17-24

- de Lorenzo V, Fernandez S, Herrero M, Jakubzik U, Timmis KN. 1993b. Engineering of alkyl- and haloaromatic-responsive gene expression with mini-transposons containing regulated promoters of biodegradative pathways of *Pseudomonas*. *Gene* 130: 41-6
- de Pascale D, Cusano AM, Autore F, Parrilli E, di Prisco G, et al. 2008. The cold-active Lip1 lipase from the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 is a member of a new bacterial lipolytic enzyme family. *Extremophiles* 12: 311-23
- De Simone G, Galdiero S, Manco G, Lang D, Rossi M, Pedone C. 2000. A snapshot of a transition state analogue of a novel thermophilic esterase belonging to the subfamily of mammalian hormone-sensitive lipase. *J Mol Biol* 303: 761-71
- De Simone G, Menchise V, Manco G, Mandrich L, Sorrentino N, et al. 2001. The crystal structure of a hyper-thermophilic carboxylesterase from the archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *J Mol Biol* 314: 507-18
- Delepelaire P. 2004. Type I secretion in gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1694: 149-61
- Deng W, Li C, Xie J. 2013. The underlying mechanism of bacterial TetR/AcrR family transcriptional repressors. *Cell Signal* 25: 1608-13
- Du W, Xu Y, Liu D, Zeng J. 2004. Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soyabean oil for biodiesel production with acyl acceptors. *J Mol Catal B-Enzym* 30: 125-29
- Duong-Ly KC, Gabelli SB. 2014. Gel filtration chromatography (size exclusion chromatography) of proteins. *Methods Enzymol* 541: 105-14
- Dworkin J. 2015. Ser/Thr phosphorylation as a regulatory mechanism in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 24C: 47-52
- Elend C, Schmeisser C, Leggewie C, Babiak P, Carballeira JD, et al. 2006. Isolation and biochemical characterization of two novel metagenome-derived esterases. *Appl Environ Microbiol* 72: 3637-45
- Elomari M, Coroler L, Hoste B, Gillis M, Izard D, Leclerc H. 1996. DNA relatedness among *Pseudomonas* strains isolated from natural mineral waters and proposal of *Pseudomonas veronii* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 46: 1138-44
- Escudero LV, Casamayor EO, Chong G, Pedros-Alio C, Demergasso C. 2013. Distribution of microbial arsenic reduction, oxidation and extrusion genes along a wide range of environmental arsenic concentrations. *PLoS One* 8: e78890
- Essghaier B, Dhieb C, Rebib H, Ayari S, Boudabous ARA, Sadfi-Zouaoui N. 2014. Antimicrobial Behavior of Intracellular Proteins from Two Moderately Halophilic Bacteria: Strain J31 of *Terribacillus halophilus* and Strain M3-23 of *Virgibacillus marismortui*. *J Plant Pathol Microb* 5: 1-7
- Ewis HE, Abdelal AT, Lu CD. 2004. Molecular cloning and characterization of two thermostable carboxyl esterases from *Geobacillus stearothermophilus*. *Gene* 329: 187-95
- Feller G, Thiry M, Gerday C. 1990. Sequence of a lipase gene from the antarctic psychrotroph *Moraxella* TA144. *Nucleic Acids Res* 18: 6431
- Fu J, Leiros HK, de Pascale D, Johnson KA, Blencke HM, Landfald B. 2013a. Functional and structural studies of a novel cold-adapted esterase from an Arctic intertidal metagenomic library. *Appl Microbiol Biotechnol* 97: 3965-78
- Fu Y, Tsui HC, Bruce KE, Sham LT, Higgins KA, et al. 2013b. A new structural paradigm in copper resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Nat Chem Biol* 9: 177-83

- Fukuda H, Kondo A, Noda H. 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *J Biosci Bioeng* 92: 405-16
- Garcia MT, Gallego V, Ventosa A, Mellado E. 2005. *Thalassobacillus devorans* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic, phenol-degrading, Gram-positive bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 55: 1789-95
- González-Bacero J, Rodríguez Hernández J, del Monte Martínez A. 2010. Las lipasas: enzimas con potencial para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados por adsorción interfacial. *Rev Colomb Biotecnol* 12: 124-40
- Gotz F, Verheij HM, Rosenstein R. 1998. *Staphylococcal* lipases: molecular characterisation, secretion, and processing. *Chem Phys Lipids* 93: 15-25
- Graham MR, Smoot LM, Migliaccio CA, Virtaneva K, Sturdevant DE, et al. 2002. Virulence control in group A *Streptococcus* by a two-component gene regulatory system: global expression profiling and *in vivo* infection modeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 13855-60
- Green MR, Sambrook J. 2012. *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Gupta SD, Lee BT, Camakaris J, Wu HC. 1995. Identification of *cutC* and *cutF* (*nlpE*) genes involved in copper tolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 177: 4207-15
- Gutiérrez Corona JF, Cervantes C. 2008. Interacciones microbianas con el cromo: mecanismos y potencial biotecnológico. *Ide@s CONCYTEG* 3: 21-36
- Hagel L. 2011. Gel filtration: size exclusion chromatography. *Methods Biochem Anal* 54: 51-91
- Haki GD, Rakshit SK. 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresour Technol* 89: 17-34
- Hama S, Yamaji H, Fukumizu T, Numata T, Tamalampudi S, et al. 2007. Biodiesel-fuel production in a packed-bed reactor using lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. *Biochem Eng J* 34: 273–8
- Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-80
- Handrick R, Reinhardt S, Focarete ML, Scandola M, Adamus G, et al. 2001. A new type of thermoalkalophilic hydrolase of *Paucimonas lemoignei* with high specificity for amorphous polyesters of short chain-length hydroxyalkanoic acids. *J Biol Chem* 276: 36215-24
- Hantke K. 2001. Bacterial zinc transporters and regulators. *Biometals* 14: 239-49
- Hemilä H, Koivula TT, Palva I. 1994. Hormonesensitive lipase is closely related to several bacterial proteins, and distantly related to acetylcholinesterase and lipoprotein lipase: identification of a superfamily of esterases and lipases. *Biochim Biophys Acta* 1210: 249-53
- Heyndrickx M, Lebbe L, Kersters K, De Vos P, Forsyth C, Logan NA. 1998. *Virgibacillus*: a new genus to accommodate *Bacillus pantothenicus* (Proom and Knight 1950). Emended description of *Virgibacillus pantothenicus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 99–106
- Heyrman J, Logan NA, Rodríguez-Díaz M, Scheldeman P, Lebbe L, et al. 2005. Study of mural painting isolates, leading to the transfer of '*Bacillus maroccanus*' and '*Bacillus carotarum*' to *Bacillus simplex*, emended description of *Bacillus simplex*, re-examination of the strains previously attributed to '*Bacillus macroides*' and description of *Bacillus muralis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 55: 119-31

- Hoffmann H, Stindl S, Stumpf A, Mehlen A, Monget D, et al. 2005. Description of *Enterobacter ludwigii* sp. nov., a novel *Enterobacter* species of clinical relevance. *Syst Appl Microbiol* 28: 206-12
- Holland IB, Schmitt L, Young J. 2005. Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway (review). *Mol Membr Biol* 22: 29-39
- Hope GC, Dean ACR. 1974. Pullulanase synthesis in *Klebsiella (Aerobacter) aerogenes* strains growing in continuous culture. *Biochem J* 144: 403-11
- Ilham Z, Saka S. 2009. Dimethyl carbonate as potential reactant in non-catalytic biodiesel production by supercritical method. *Bioresour Technol* 100: 1793-6
- Ilham Z, Saka S. 2010. Two-step supercritical dimethyl carbonate method for biodiesel production from *Jatropha curcas* oil. *Bioresour Technol* 101: 2735-40
- Ishikawa M, Ishizaki S, Yamamoto Y, Yamasato K. 2002. *Paraliobacillus ryukyuensis* gen. nov., sp. nov., a new Gram-positive, slightly halophilic, extremely halotolerant, facultative anaerobe isolated from a decomposing marine alga. *J Gen Appl Microbiol* 48: 269-79
- Ishikawa M, Nakajima K, Itamiya Y, Furukawa S, Yamamoto Y, Yamasato K. 2005. *Halolactibacillus halophilus* gen. nov., sp. nov. and *Halolactibacillus miurensis* sp. nov., halophilic and alkaliphilic marine lactic acid bacteria constituting a phylogenetic lineage in *Bacillus* rRNA group 1. *Int J Syst Evol Microbiol* 55: 2427-39
- Iso M, Chem B, Eguchi M, Kudo T, Shrestha S. 2001. Production of Biodiesel from triglycerides and ethanol using immobilized enzyme. *J Mol Catal B Enzym* 16: 53-58
- Jaeger KE, Eggert T. 2002. Lipases for biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 13: 390-7
- Jeffries CD, Holtman DF, Guse DG. 1957. Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acids. *J Bacteriol* 73: 590-1
- Kaieda M, Samukawa T, Kondo A, Fukuda H. 2001. Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system. *J Biosci Bioeng* 91: 12-5
- Kamble KD, Koche DK, Musaddiq M. 2010. Search of efficient DNase producing bacteria from soil. *Deccan. Current Science* 3: 162-69
- Kapoor M, Gupta MN. 2012. Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochem.* 47: 555-69
- Kashima Y, Iijima M, Okamoto A, Koizumi Y, Udaka S, Yanahida F. 1998. Purification and characterization of intracellular esterases related to ethylacetate formation in *Acetobacter pasteurianus*. *J Ferment Bioeng* 85: 584-88
- Kashima Y, Nakajima Y, Nakano T, Tayama K, Koizumi Y, et al. 1999. Cloning and characterization of ethanol-regulated esterase genes in *Acetobacter pasteurianus*. *J Biosci Bioeng* 87: 19-27
- Kawakami K, Oda Y, Takahashi R. 2011. Application of a *Burkholderia cepacia* lipase-immobilized silica monolith to batch and continuous biodiesel production with a stoichiometric mixture of methanol and crude *Jatropha* oil. *Biotechnol Biofuels* 4: 42
- Kehres DG, Lawyer CH, Maguire ME. 1998. The CorA magnesium transporter gene family. *Microb Comp Genomics* 3: 151-69
- Kim EY, Oh KH, Lee MH, Kang CH, Oh TK, Yoon JH. 2009. Novel cold-adapted alkaline lipase from an intertidal flat metagenome and proposal for a new family of bacterial lipases. *Appl Environ Microbiol* 75: 257-60
- Kim HK, Park SY, Lee JK, Oh TK. 1998. Gene cloning and characterization of thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* L1. *Biosci Biotechnol Biochem* 62: 66-71

- Kim YG, Hwang CY, Yoo KW, Moon HT, Yoon JH, Cho BC. 2007. *Pelagibacillus goriensis* gen. nov., sp. nov., a moderately halotolerant bacterium isolated from coastal water off the east coast of Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 1554-60
- Kim YJ, Choi GS, Kim SB, Yoon GS, Kim YS, Ryu YW. 2006. Screening and characterization of a novel esterase from a metagenomic library. *Protein Expr Purif* 45: 315-23
- Kleeberg I, Welzel K, Vandenheuvel J, Muller RJ, Deckwer WD. 2005. Characterization of a new extracellular hydrolase from *Thermobifida fusca* degrading aliphatic-aromatic copolyesters. *Biomacromolecules* 6: 262-70
- Koster M, Bitter W, Tommassen J. 2000. Protein secretion mechanisms in Gram-negative bacteria. *Int J Med Microbiol* 290: 325-31
- Krishnamurthi S, Chakrabarti T. 2008. Proposal for transfer of *Pelagibacillus goriensis* Kim et al. 2007 to the genus *Terribacillus* as *Terribacillus goriensis* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 2287-91
- Kuroda M, Hayashi H, Ohta T. 1999. Chromosome-determined zinc-responsible operon *czr* in *Staphylococcus aureus* strain 912. *Microbiol Immunol* 43: 115-25
- Kwon HJ, Haruki M, Morikawa M, Omori K, Kanaya S. 2002. Role of repetitive nine-residue sequence motifs in secretion, enzymatic activity, and protein conformation of a family I.3 lipase. *J Biosci Bioeng* 93: 157-64
- Lane DJ. 1991. 16S/23S rRNA sequencing In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, ed. SEG M, pp. 115-48. Chichester, UK: Wiley
- Lebrun M, Audurier A, Cossart P. 1994. Plasmid-borne cadmium resistance genes in *Listeria monocytogenes* are similar to *cadA* and *cadC* of *Staphylococcus aureus* and are induced by cadmium. *J Bacteriol* 176: 3040-8
- Lee D, Koh Y, Kim K, Kim B, Choi H, et al. 1999. Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS Microbiol Lett* 179: 393-400
- Lee MH, Hong KS, Malhotra S, Park JH, Hwang EC, et al. 2010. A new esterase EstD2 isolated from plant rhizosphere soil metagenome. *Appl Microbiol Biotechnol* 88: 1125-34
- Lee MH, Lee CH, Oh TK, Song JK, Yoon JH. 2006. Isolation and characterization of a novel lipase from a metagenomic library of tidal flat sediments: evidence for a new family of bacterial lipases. *Appl Environ Microbiol* 72: 7406-9
- Lenfant N, Hotelier T, Velluet E, Bourne Y, Marchot P, Chatonnet A. 2012. ESTHER, the database of the a/b-hydrolase fold superfamily of proteins: tools to explore diversity of functions. *Nucleic Acids Res* 41: 423-29
- Levisson M, van der Oost J, Kengen SW. 2007. Characterization and structural modeling of a new type of thermostable esterase from *Thermotoga maritima*. *FEBS J* 274: 2832-42
- Li L, Du W, Liu D, Wang L, Li Z. 2006. Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium. *J Mol Catal B Enzym* 43 58-62
- Li M, Yang LR, Xu G, Wu JP. 2013. Screening, purification and characterization of a novel cold-active and organic solvent-tolerant lipase from *Stenotrophomonas maltophilia* CGMCC 4254. *Bioresour Technol* 148: 114-20
- Lim JM, Jeon CO, Song SM, Kim CJ. 2005. *Pontibacillus chungwhensis* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic Gram-positive bacterium from a solar saltern in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* 55: 165-70
- Lindsay WL, Norvell WA. 1978. Development of a DTPA Soil Test for Zinc, Iron, Manganese, and Copper. *Soil Sci Soc Am J* 42: 421-28

- Liu J, Rosen BP. 1997. Ligand interactions of the ArsC arsenate reductase. *J Biol Chem* 272: 21084-9
- Liu P, Wang YF, Ewis HE, Abdelal AT, Lu CD, et al. 2004. Covalent reaction intermediate revealed in crystal structure of the *Geobacillus stearothermophilus* carboxylesterase Est30. *J Mol Biol* 342: 551-61
- Liu W, Jiang L, Guo C, Yang SS. 2010. *Terribacillus aidingensis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 60: 2940-5
- Liu Y, Liu T, Wang X, Xu L, Yan Y. 2011. Biodiesel synthesis catalyzed by *Burkholderia cenocepacia* lipase supported on macroporous resin NKA in solvent-free and isooctane systems. *Energy Fuel* 25 1206–12
- Lopez NI, Pettinari MJ, Stackebrandt E, Tribelli PM, Potter M, et al. 2009. *Pseudomonas extremaustralis* sp. nov., a Poly(3-hydroxybutyrate) producer isolated from an antarctic environment. *Curr Microbiol* 59: 514-9
- Lu J, Nogi Y, Takami H. 2001. *Oceanobacillus iheyensis* gen. nov., sp. nov., a deep-sea extremely halotolerant and alkaliphilic species isolated from a depth of 1050 m on the Iheya Ridge. *FEMS Microbiol Lett* 205: 291-7
- Luna C, Sancho E, Luna D, Caballero V, Calero J, et al. 2013. Biofuel that Keeps Glycerol as Monoglyceride by 1,3-Selective Ethanolysis with Pig Pancreatic Lipase Covalently Immobilized on AlPO₄ Support. *Energies* 6: 3879-900
- Ma Q, Zhai Y, Schneider JC, Ramseier TM, Saier MH, Jr. 2003. Protein secretion systems of *Pseudomonas aeruginosa* and *P. fluorescens*. *Biochim Biophys Acta* 1611: 223-33
- Maciaszczyk-Dziubinska E, Wawrzycka D, Wysocki R. 2012. Arsenic and antimony transporters in eukaryotes. *Int J Mol Sci* 13: 3527-48
- Manco G, Febbraio F, Adinolfi E, Rossi M. 1999. Homology modeling and active-site residues probing of the thermophilic *Alicyclobacillus acidocaldarius* esterase 2. *Protein Sci* 8: 1789-96
- Martinez-Perez O, Moreno-Ruiz E, Floriano B, Santero E. 2004. Regulation of tetralin biodegradation and identification of genes essential for expression of thn operons. *J Bacteriol* 186: 6101-9
- Masomian M, Rahman RN, Salleh AB, Basri M. 2016. Analysis of Comparative Sequence and Genomic Data to Verify Phylogenetic Relationship and Explore a New Subfamily of Bacterial Lipases. *PLoS One* 11: e0149851
- Mayr R, Busse HJ, Worliczek HL, Ehling-Schulz M, Scherer S. 2006. *Ornithinibacillus* gen. nov., with the species *Ornithinibacillus bavariensis* sp. nov. and *Ornithinibacillus californiensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 1383-9
- McCue JT. 2009. Theory and use of hydrophobic interaction chromatography in protein purification applications. *Methods Enzymol* 463: 405-14
- Meier R, Drepper T, Svensson V, Jaeger KE, Baumann U. 2007. A calcium-gated lid and a large beta-roll sandwich are revealed by the crystal structure of extracellular lipase from *Serratia marcescens*. *J Biol Chem* 282: 31477-83
- Messaoudi A, Belguith H, Gram I, Hamida JB. 2010. Classification of EC 3.1.1.3 bacterial true lipases using phylogenetic analysis. *Afr J Biotechnol* 9: 8243-47
- Meyer A, Gottheil O. 1901. Botanische beschreibung einiger bodenbakterien. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. II* 7: 680-91

- Miskin JE, Farrell AM, Cunliffe WJ, Holland KT. 1997. *Propionibacterium acnes*, a resident of lipid-rich human skin, produces a 33 kDa extracellular lipase encoded by *gehA*. *Microbiology* 143 (Pt 5): 1745-55
- Mittelbach M. 1990. Lipase catalyzed alcoholysis of sunflower oil. *J Am Oil Chem Soc* 67: 168-70
- Modi MK, Reddy JR, Rao BV, Prasad RB. 2006. Lipase-mediated transformation of vegetable oils into biodiesel using propan-2-ol as acyl acceptor. *Biotechnol Lett* 28: 637-40
- Modi MK, Reddy JR, Rao BV, Prasad RB. 2007. Lipase-mediated conversion of vegetable oils into biodiesel using ethyl acetate as acyl acceptor. *Bioresour Technol* 98: 1260-4
- Molgaard A. 2003. Rhamnogalacturonan acetyltransferase, a member of the SGNH-hydrolase family In *Advances in Pectin and Pectinase Research*, ed. FVHSRGF Visser, pp. 299-313. The Netherlands Kluwer Academic
- Montoro S, Martínez I, Navarro J, Takami H, García F, Sánchez A. 2009. Characterization of a novel thermostable carboxylesterase from *Geobacillus kaustophilus* HTA426 shows the existence of a new carboxylesterase family. *J. Bacteriol* 191: 3076-85
- Moore CM, Gaballa A, Hui M, Ye RW, Helmann JD. 2005. Genetic and physiological responses of *Bacillus subtilis* to metal ion stress. *Mol Microbiol* 57: 27-40
- Morgan FJ, Adams KR, Priest FG. 1979. A cultural method for the detection of pullulan--degrading enzymes in bacteria and its application to the genus *Bacillus*. *J Appl Bacteriol* 46: 291-4
- Munkelt D, Grass G, Nies DH. 2004. The chromosomally encoded cation diffusion facilitator proteins DmeF and FieF from *Wautersia metallidurans* CH34 are transporters of broad metal specificity. *J Bacteriol* 186: 8036-43
- Murphy J, Riley JP. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta* 27: 31-36
- Nagai K, Ihara Y, Wada Y, Taniguchi N. 1997. N-glycosylation is requisite for the enzyme activity and Golgi retention of N-acetylglucosaminyltransferase III. *Glycobiology* 7: 769-76
- Nardini M, Dijkstra BW. 1999. Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Curr Opin Struct Biol* 9: 732-7
- Nardini M, Lang DA, Liebeton K, Jaeger KE, Dijkstra BW. 2000. Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in the open conformation. The prototype for family I.1 of bacterial lipases. *J Biol Chem* 275: 31219-25
- Nelson LA, Foglia TA, Marmer WN. 1996. Lipase-catalyzed production of biodiesel. *J Am Oil Chem Soc* 73: 1191-95
- Nies DH, Silver S. 1995. Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *J Ind Microbiol* 14: 186-99
- Nishizawa M, Shimizu M, Ohkawa H, Kanaoka M. 1995. Stereoselective production of (+)-trans-chrysanthenic acid by a microbial esterase: cloning, nucleotide sequence, and overexpression of the esterase gene of *Arthrobacter globiformis* in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 61: 3208-15
- Nthangeni MB, Patterton H, van Tonder A, Vergeer WP, Litthauer D. 2001. Over-expression and properties of a purified recombinant *Bacillus licheniformis* lipase: a comparative report on *Bacillus lipases*. *Enzyme Microbiol Technol* 28: 705-12
- Nthangeni MB, Ramagoma F, Tlou MG, Litthauer D. 2005. Development of a versatile cassette for directional genome walking using cassette ligation-mediated PCR and its application in the cloning of complete lipolytic genes from *Bacillus species*. *J Microbiol Methods* 61: 225-34

- Nunes I, Tiago I, Pires AL, da Costa MS, Verissimo A. 2006. *Paucisalibacillus globulus* gen. nov., sp. nov., a Gram-positive bacterium isolated from potting soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 1841-5
- Ogino H, Mimitsuka T, Muto T, Matsumura M, Yasuda M, et al. 2004. Cloning, expression, and characterization of a lipolytic enzyme gene (*lip8*) from *Pseudomonas aeruginosa* LST-03. *J Mol Microbiol Biotechnol* 7: 212-23
- Ognjanovic N, Bezbradica D, Knezevic-Jugovic Z. 2009. Enzymatic conversion of sunflower oil to biodiesel in a solvent-free system: process optimization and the immobilized system stability. *Bioresour Technol* 100: 5146-54
- Olsen SR, Cole CV, Watanabe FS, Dean LA. 1954. *Estimation of available phosphorous in soil by extraction with sodium bicarbonate*. Washington, D.C. : U.S. Dept. of Agriculture. 19 pp.
- Ordóñez E, Letek M, Valbuena N, Gil JA, Mateos LM. 2005. Analysis of genes involved in arsenic resistance in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Appl Environ Microbiol* 71: 6206-15
- Overton TW. 2014. Recombinant protein production in bacterial hosts. *Drug Discov Today* 19: 590-601
- Paez-Espino AD, Durante-Rodríguez G, de Lorenzo V. 2015. Functional coexistence of twin arsenic resistance systems in *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* 17: 229-38
- Páez-Espino D, Tamames J, de Lorenzo V, Cánovas D. 2009. Microbial responses to environmental arsenic. *Biometals* 22: 117-30
- Pandey A, Selvakumar P, Soccol CR, Nigam P. 1999. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Curr Sci* 77: 149-62
- Paula AV, Urioste D, Santos JC, de Castro HF. 2007. Porcine pancreatic lipase immobilized on polysiloxane-polyvinyl alcohol hybrid matrix: catalytic properties and feasibility to mediate synthesis of surfactants and biodiesel. *J Chem Technol Biotechnol* 82: 281–88
- Pemberton JM, Kidd SP, Schmidt R. 1997. Secreted enzymes of *Aeromonas*. *FEMS Microbiol Lett* 152: 1-10
- Perez C, Juárez K, García-Castells E, Soberón G, Servín-González L. 1993. Cloning, characterization, and expression in *Streptomyces lividans* 66 of an extracellular lipase-encoding gene from *Streptomyces* sp. M11. *Gene* 123: 109-14
- Petersen EI, Valinger G, Solkner B, Stubenrauch G, Schwab H. 2001. A novel esterase from *Burkholderia gladioli* which shows high deacetylation activity on cephalosporins is related to beta-lactamases and DD-peptidases. *J Biotechnol* 89: 11-25
- Petrarca P, Ammendola S, Pasquali P, Battistoni A. 2010. The Zur-regulated ZinT protein is an auxiliary component of the high-affinity ZnuABC zinc transporter that facilitates metal recruitment during severe zinc shortage. *J Bacteriol* 192: 1553-64
- Popoff M, Veron M. 1976. A taxonomic study of the *Aeromonas hydrophila*-*Aeromonas punctata* group. *J Gen Microbiol* 94: 11-22
- Porta Casanellas J, López-Acevedo Reguerín M, Rodríguez Ochoa R. 1986. *Técnicas y Experimentos en Edafología*. pp. 282.
- Pugsley AP. 1992. Translocation of a folded protein across the outer membrane in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 12058-62
- Qin HE, Yan X, Yun T, Dong W. 2008. Biodiesel production catalyzed by whole-cell lipase from *Rhizopus chinensis*. *Chin J Catal* 29 41–46
- Queiroz JA, Tomaz CT, Cabral JM. 2001. Hydrophobic interaction chromatography of proteins. *J Biotechnol* 87: 143-59

- Rademacher C, Masepohl B. 2012. Copper-responsive gene regulation in bacteria. *Microbiology* 158: 2451-64
- Ramírez-Díaz MI, Díaz-Pérez C, Vargas E, Riveros-Rosas H, Campos-García J, Cervantes C. 2008. Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *Biometals* 21: 321-32
- Ramos JL, Martínez-Bueno M, Molina-Henares AJ, Teran W, Watanabe K, et al. 2005. The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol Mol Biol Rev* 69: 326-56
- Ranganathan SV, Narasimhan SL, Muthukumar K. 2008. An overview of enzymatic production of biodiesel. *Bioresour Technol* 99: 3975-81
- Rao L, Xue Y, Zhou C, Tao J, Li G, et al. 2011. A thermostable esterase from *Thermoanaerobacter tengcongensis* opening up a new family of bacterial lipolytic enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1814: 1695-702
- Reder A, Hoper D, Weinberg C, Gerth U, Fraunholz M, Hecker M. 2008. The Spx paralogue MgsR (YqgZ) controls a subregulon within the general stress response of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 69: 1104-20
- Ren PG, Zhou PJ. 2005a. *Salinibacillus aidingensis* gen. nov., sp. nov. and *Salinibacillus kushneri* sp. nov., moderately halophilic bacteria isolated from a neutral saline lake in Xin-Jiang, China. *Int J Syst Evol Microbiol* 55: 949-53
- Ren PG, Zhou PJ. 2005b. *Tenuibacillus multivorans* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from saline soil in Xin-Jiang, China. *Int J Syst Evol Microbiol* 55: 95-9
- Rensing C, Grass G. 2003. *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiol Rev* 27: 197-213
- Reyes A, Leiva A, Cambiazo V, Mendez MA, Gonzalez M. 2006. Cop-like operon: structure and organization in species of the *Lactobacillales* order. *Biol Res* 39: 87-93
- Ribeiro BD, de Castro AM, Coelho MA, Freire DM. 2011. Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. *Enzyme Res* 2011: 615803
- Robles-Medina A, Gonzalez-Moreno PA, Esteban-Cerdan L, Molina-Grima E. 2009. Biocatalysis: towards ever greener biodiesel production. *Biotechnol Adv* 27: 398-408
- Rolain T, Bernard E, Beaussart A, Degand H, Courtin P, et al. 2013. O-glycosylation as a novel control mechanism of peptidoglycan hydrolase activity. *J Biol Chem* 288: 22233-47
- Rosenstein R, Gotz F. 2000. *Staphylococcal* lipases: biochemical and molecular characterization. *Biochimie* 82: 1005-14
- Roy S, Packer L. 1998. Redox regulation of cell functions by alpha-lipoate: biochemical and molecular aspects. *Biofactors* 8: 17-21
- Royon D, Daz M, Ellenrieder G, Locatelli S. 2007. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent. *Bioresour Technol* 98: 648-53
- Rua ML, Schmidt-Dannert C, Wahl S, Sprauer A, Schmid RD. 1997. Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenuatus* large-scale production, purification and properties: aggregation behaviour and its effect on activity. *J Biotechnol* 56: 89-102
- Ruiz C, Blanco A, Pastor FI, Diaz P. 2002. Analysis of *Bacillus megaterium* lipolytic system and cloning of LipA, a novel subfamily I.4 bacterial lipase. *FEMS Microbiol Lett* 217: 263-7
- Ruiz C, Falcocchio S, Pastor FI, Saso L, Diaz P. 2007. *Helicobacter pylori* EstV: identification, cloning, and characterization of the first lipase isolated from an epsilon-proteobacterium. *Appl Environ Microbiol* 73: 2423-31
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-25

- Saka S, Isayama Y. 2009. A new process for catalyst-free production of biodiesel using supercritical methyl acetate. *Fuel* 88: 1307–13
- Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samukawa T, Kaieda M, Matsumoto T, Ban K, Kondo A, et al. 2000. Pretreatment of immobilized *Candida antarctica* lipase for biodiesel fuel production from plant oil. *J Biosci Bioeng* 90: 180-3
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-7
- Sarda L, Desnuelle P. 1958. Actions of pancreatic lipase on esters in emulsions. *Biochim Biophys Acta* 30: 513-21
- Sato T, Kobayashi Y. 1998. The ars operon in the skin element of *Bacillus subtilis* confers resistance to arsenate and arsenite. *J Bacteriol* 180: 1655-61
- Sayari A, Agrebi N, Jaoua S, Gargouri Y. 2001. Biochemical and molecular characterization of *Staphylococcus simulans* lipase. *Biochimie* 83: 863-71
- Schleicher M, Watterson DM. 1983. Analysis of differences between coomassie blue stain and silver stain procedures in polyacrylamide gels: conditions for the detection of calmodulin and troponin C. *Anal Biochem* 131: 312-17
- Schlesner H, Lawson PA, Collins MD, Weiss N, Wehmeyer U, et al. 2001. *Filobacillus milensis* gen. nov., sp. nov., a new halophilic spore-forming bacterium with Orn-D-Glu-type peptidoglycan. *Int J Syst Evol Microbiol* 51: 425-31
- Schutte M, Fetzner S. 2007. EstA from *Arthrobacter nitroguajacolicus* Ru61a, a thermo- and solvent-tolerant carboxylesterase related to class C beta-lactamases. *Curr Microbiol* 54: 230-36
- Shimada Y, Watanabe Y, Samukawa T, Sugibara A, Noda IL, et al. 1999. Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. *J Am Oil Chem Soc* 76 789–93
- Shimada Y, Watanabe Y, Sugihara A, Tominaga Y. 2002. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction oil processing. *J Mol Catal B Enzym* 17: 133–42
- Short JM, Fernandez JM, Sorge JA, Huse WD. 1988. *Lambda* ZAP: a bacteriophage *lambda* expression vector with in vivo excision properties. *Nucleic Acids Res* 16: 7583-600
- Silverman MP, Lundgren DG. 1959. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. II. Manometric studies. *J Bacteriol* 78: 326-31
- Singh SP, Singh D. 2010. Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: A review. *Renew Sust Energ Rev* 14: 200-16
- Slyemi D, Bonnefoy V. 2012. How prokaryotes deal with arsenic. *Environ Microbiol Rep* 4: 571-86
- Smith RL, Gottlieb E, Kucharski LM, Maguire ME. 1998a. Functional similarity between archaeal and bacterial CorA magnesium transporters. *J Bacteriol* 180: 2788-91
- Smith RL, Szegedy MA, Kucharski LM, Walker C, Wiet RM, et al. 1998b. The CorA Mg²⁺ transport protein of *Salmonella typhimurium*. Mutagenesis of conserved residues in the third membrane domain identifies a Mg²⁺ pore. *J Biol Chem* 273: 28663-9
- Smoot LM, Smoot JC, Graham MR, Somerville GA, Sturdevant DE, et al. 2001. Global differential gene expression in response to growth temperature alteration in group A *Streptococcus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 10416-21

- Sommer P, Bormann C, Gotz F. 1997. Genetic and biochemical characterization of a new extracellular lipase from *Streptomyces cinnamomeus*. *Appl Environ Microbiol* 63: 3553-60
- Sorensen HP, Mortensen KK. 2005. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* 4: 1
- Sponder G, Svidova S, Schweigel M, Vormann J, Kolisek M. 2010. Splice-variant 1 of the ancient domain protein 2 (ACDP2) complements the magnesium-deficient growth phenotype of *Salmonella enterica* sv. *typhimurium* strain MM281. *Magnes Res* 23: 105-14
- Spring S, Ludwig W, Marquez MC, Ventosa A, Schleifer KH. 1996. *Halobacillus* gen. nov., with descriptions of *Halobacillus litoralis* sp. nov. and *Halobacillus trueperi* sp. nov., and transfer of *Sporosarcina halophila* to *Halobacillus halophilus* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 46: 492–96
- Stanier RY. 1943. A Note on the Taxonomy of *Proteus Hydrophilus*. *J Bacteriol* 46: 213-4
- Stergiou PY, Foukis A, Filippou M, Koukouritaki M, Parapouli M, et al. 2013. Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. *Biotechnol Adv* 31: 1846-59
- Stuer W, Jaeger KE, Winkler UK. 1986. Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 168: 1070-4
- Sue D, Fink D, Wiedmann M, Boor KJ. 2004. sigmaB-dependent gene induction and expression in *Listeria monocytogenes* during osmotic and acid stress conditions simulating the intestinal environment. *Microbiology* 150: 3843-55
- Sugita H, Kawasaki J, Deguchi Y. 1997. Production of amylase by the intestinal microflora in cultured freshwater fish. *Lett Appl Microbiol* 24: 105-08
- Sulong MR, Abdul Rahman RN, Salleh AB, Basri M. 2006. A novel organic solvent tolerant lipase from *Bacillus sphaericus* 205y: extracellular expression of a novel OST-lipase gene. *Protein Expr Purif* 49: 190-5
- Sumner ME, Miller WP. 1996. Cation Exchange Capacity and Exchange Coefficients In *Methods of Soil Analysis. Part 3 - Chemical Methods.*, ed. DL Sparks, pp. 1201-30. Madison WI
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596-9
- Tamura K, Nei M, Kumar S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 11030-5
- Teng Y, Xu Y. 2007. A modified para-nitrophenyl palmitate assay for lipase synthetic activity determination in organic solvent. *Anal Biochem* 363: 297-9
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25: 4876-82
- Tomassen J, Filloux A, Bally M, Murgier M, Lazdunski A. 1992. Protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev* 9: 73-90
- Tomova I, Gladka G, Tashyrev A, Vasileva-Tonkova E. 2014. Isolation, identification and hydrolytic enzymes production of aerobic heterotrophic bacteria from two Antarctic islands. *Int J Environ Sci* 4: 614-25
- Tomova I, Lazarkevich I, Tomova A, Kambourova M, Vasileva-Tonkova E. 2013. Diversity and biosynthetic potential of culturable aerobic heterotrophic bacteria isolated from Magura Cave, Bulgaria. *Int J Speleol* 42: 65-76
- Treichel H, de Oliveira D, Mazutti MA, Di Luccio M, Oliveira JV. 2010. A Review on Microbial Lipases Production. *Food Bioprocess Technol.* 3: 182-96

- Tsai SL, Singh S, Chen W. 2009. Arsenic metabolism by microbes in nature and the impact on arsenic remediation. *Curr Opin Biotechnol* 20: 659-67
- Tyndall JD, Sinchaikul S, Fothergill-Gilmore LA, Taylor P, Walkinshaw MD. 2002. Crystal structure of a thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1. *J Mol Biol* 323: 859-69
- Uchida H, Shigeno-Akutsu Y, Nomura N, Nakahara T, Nakajima-Kambe T. 2002. Cloning and sequence analysis of poly(tetramethylene succinate) depolymerase from *Acidovorax delafieldii* strain BS-3. *J Biosci Bioeng* 93: 245-7
- Van Pouderoyen G, Eggert T, Jaeger KE, Dijkstra BW. 2001. The Crystal Structure of *Bacillus subtilis* Lipase : A Minimal alpha/beta Hydrolase Fold Enzyme. *J Mol Biol* 309: 215-26
- Verdugo C, Luque R, Luna D, Hidalgo JM, Posadillo A, et al. 2010. A comprehensive study of reaction parameters in the enzymatic production of novel biofuels integrating glycerol into their composition. *Bioresour Technol* 101: 6657-62
- Verma N, Thakur S, Bhatt AK. 2012. Microbial Lipases: Industrial Applications and Properties. *Int Res J Biological Sci* 1: 88-92
- Viti C, Marchi E, Decorosi F, Giovannetti L. 2014. Molecular mechanisms of Cr(VI) resistance in bacteria and fungi. *FEMS Microbiol Rev* 38: 633-59
- Wagner UG, Petersen EI, Schwab H, Kratky C. 2002. EstB from *Burkholderia gladioli*: a novel esterase with a beta-lactamase fold reveals steric factors to discriminate between esterolytic and beta-lactam cleaving activity. *Protein Sci* 11: 467-78
- Waino M, Tindall BJ, Schumann P, Ingvorsen K. 1999. *Gracilibacillus* gen. nov., with description of *Gracilibacillus halotolerans* gen. nov., sp. nov.; transfer of *Bacillus dipsosauri* to *Gracilibacillus dipsosauri* comb. nov., and *Bacillus salexigens* to the genus *Salibacillus* gen. nov., as *Salibacillus salexigens* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 49 Pt 2: 821-31
- Wang CY, Shi JD, Yang P, Kumar PG, Li QZ, et al. 2003. Molecular cloning and characterization of a novel gene family of four ancient conserved domain proteins (ACDP). *Gene* 306: 37-44
- Wang J, Shen WJ, Patel S, Harada K, Kraemer FB. 2005. Mutational analysis of the "regulatory module" of hormone-sensitive lipase. *Biochemistry* 44: 1953-9
- Wei Y, Contreras JA, Sheffield P, Osterlund T, Derewenda U, et al. 1999. Crystal structure of brefeldin A esterase, a bacterial homolog of the mammalian hormone-sensitive lipase. *Nat Struct Biol* 6: 340-5
- Wei Y, Swenson L, Castro C, Derewenda U, Minor W, et al. 1998. Structure of a microbial homologue of mammalian platelet-activating factor acetylhydrolases: *Streptomyces exfoliatus* lipase at 1.9 Å resolution. *Structure* 6: 511-9
- Whon TW, Roh SW, Shin NR, Kim MS, Kim YO, Bae JW. 2011. Genome sequence of strain TW25, a novel member of the genus *Ornithinibacillus* in the family *Bacillaceae*. *J Bacteriol* 193: 2884-5
- Wilhelm S, Tommassen J, Jaeger KE. 1999. A novel lipolytic enzyme located in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 181: 6977-86
- Yamamura S, Amachi S. 2014. Microbiology of inorganic arsenic: From metabolism to bioremediation. *J Biosci Bioeng* 118: 1-9
- Yan J, Zheng X, Du L, Li S. 2014a. Integrated lipase production and in situ biodiesel synthesis in a recombinant *Pichia pastoris* yeast: an efficient dual biocatalytic system composed of cell free enzymes and whole cell catalysts. *Biotechnol Biofuels* 7: 55
- Yan J, Zheng X, Li S. 2014b. A novel and robust recombinant *Pichia pastoris* yeast whole cell biocatalyst with intracellular overexpression of a *Thermomyces lanuginosus* lipase:

- preparation, characterization and application in biodiesel production. *Bioresour Technol* 151: 43-8
- Yang JC, Small MW, Grieshaber RV, Nuzzo RG. 2012. Recent developments and applications of electron microscopy to heterogeneous catalysis. *Chem Soc Rev* 41: 8179-94
- Yoo HY, Simkhada JR, Cho SS, Park DH, Kim SW, et al. 2011. A novel alkaline lipase from *Ralstonia* with potential application in biodiesel production. *Bioresour Technol* 102: 6104-11
- Yoon JH, Kang KH, Park YH. 2002. *Lentibacillus salicampi* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a salt field in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* 52: 2043-8
- Young CA, Gordon LD, Fang Z, Holder RC, Reid SD. 2015. Copper Tolerance and Characterization of a Copper-Responsive Operon, *copYAZ*, in an M1T1 Clinical Strain of *Streptococcus pyogenes*. *J Bacteriol* 197: 2580-92
- Yusuf NNAN, Kamarudin SK, Yaakub Z. 2011. Overview on the current trends in biodiesel production. *Energ Convers Manage* 52: 2741-51
- Zhang B, Weng Y, Xu H, Mao Z. 2012. Enzyme immobilization for biodiesel production. *Appl Microbiol Biotechnol* 93: 61-70
- Zhang Y, Dube MA, McLean DD, Kates M. 2003. Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process design and technological assessment. *Bioresour Technol* 89: 1-16
- Zhen-qian Z, Chun-yun G. 2008. Screening for lipase-producing *Enterobacter agglomerans* for biodiesel catalyzation. *Afr J Biotechnol* 8: 1273-79
- Zhu X, Larsen NA, Basran A, Bruce NC, Wilson IA. 2003. Observation of an arsenic adduct in an acetyl esterase crystal structure. *J Biol Chem* 278: 2008-14
- Zuber P. 2004. Spx-RNA polymerase interaction and global transcriptional control during oxidative stress. *J Bacteriol* 186: 1911-8